

**Phosphoproteom-Analysen humaner Kinasen:
Charakterisierung des c-Met-Signalweges
nach Aktivierung durch
InIB von *Listeria monocytogenes***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

**von Tobias Reinl
aus Bayreuth**

1. Referent: Prof. Jürgen Wehland
2. Referentin: Prof. Petra Dersch
eingereicht am: 07. Januar 2008
mündliche Prüfung (Disputation) am: 10.04.2008

Druckjahr 2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin/den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

T. Reinl, J. Wissing, C. Hundertmark, F. Klawonn, M. Nimtz, J. Wehland, H. Daub, L. Jänsch: Quantitative Analysis of Receptor Tyrosine-Kinase Signaling Exploited by *Listeria monocytogenes*. (Poster) Workshop in the Experimental Sciences on Signal Transduction in Host-Bacterial Interactions. Jerusalem, Israel. Oktober **2007**.

T. Reinl, J. Wissing, R. Fischer, C. Hundertmark, F. Klawonn, M. Nimtz, J. Wehland, H. Daub, L. Jänsch: Quantitative Analysis of Receptor Tyrosine-Kinase Signaling Exploited by *Listeria monocytogenes*. (Poster) Targeting the Kinome. Basel, Schweiz. Dezember **2006**.

T. Reinl, J. Wissing, R. Fischer, C. Hundertmark, F. Klawonn, M. Nimtz, J. Wehland, H. Daub, L. Jänsch: Quantitative Analysis of Receptor Tyrosine-Kinase Signaling Exploited by *Listeria monocytogenes*. (Poster) HUPO 5th Annual World Congress. Long Beach, Kalifornien, USA. Oktober **2006**. Abstract: Molecular and Cellular Proteomics 2006; 5.10: 168.

T. Reinl: Phosphorylation Studies of c-Met Signaling. Signal Pathways to the Cytoskeleton and Bacterial Pathogenesis (SPP1150). (Vortrag) Freiburg, Deutschland. März **2006**.

T. Reinl: Comparative Phosphorylation Studies after Receptor Activation by the *Listerial* Virulence Factor InlB. (Vortrag) European BioPerspectives. Wiesbaden, Deutschland. Mai **2005**.

T. Reinl, R. Fischer, J. Wehland and L. Jänsch: Comparative Phosphorylation Studies after Receptor Activation by the *Listerial* Virulence Factor InlB. Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis (FEMS Meeting). (Poster) Ein Gedi, Israel. Januar **2005**.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Mai 2004 bis Dezember 2007
unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Jürgen Wehland

in der Abteilung für Zellbiologie am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI)
in Braunschweig angefertigt.

Abstract

Tobias Reinl

Abt. Zellbiologie (Prof. J. Wehland)

Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung

D-38124 Braunschweig, Deutschland

Tobias.Reinl@helmholtz-hzi.de

Die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met reguliert eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Nach Stimulation durch seinen physiologischen Liganden HGF/SF kontrolliert c-Met Signalkaskaden, die zu mitogenen, motogenen und morphogenen Prozessen führen. Im Gegensatz zur physiologischen Situation nutzt das human-pathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* die c-Met-Signalübertragung, um seine Phagozytose in unterschiedliche Zelltypen zu induzieren. Die LRR-Domäne des *listeriellen* Virulenzfaktors Internalin B (InlB) ist ausreichend, um an c-Met zu binden und die Kinase-Domäne zu aktivieren. Die darauf folgende Signalkaskade resultiert in einer komplexen Reorganisation des Zytoskeletts und der Reißverschluss-artigen Aufnahme des Pathogens in das Cytosol der Wirtszelle. Die Phosphorylierungs-abhängige Signalübertragung im c-Met-Signalweg wird durch Kinasen wie Src, PAK oder Akt reguliert. Bestehend aus über 500 Mitgliedern zählen Proteinkinasen zu einer der größten durch das humane Genom kodierten Proteinfamilien. Ihr Aktivitäts-Status, das Potential zur Ausbildung von Protein-Interaktionen und deren zelluläre Lokalisation ist hauptsächlich durch spezifische Phosphorylierung an Serin-, Threonin- und Tyrosin-Seitenketten bestimmt. Aus diesem Grund würde ein detailliertes Verständnis über den Phosphorylierungs-Status von Kinasen nach Aktivierung der c-Met-Signalkaskade durch InlB unser bestehendes Wissen über zelluläre Konsequenzen in der Wirt-Pathogen-Interaktion vervollständigen.

Die Untersuchung von Kinase-Substraten durch systematische Phosphoproteom-Studien ist mittlerweile ein gut etablierter Ansatz. Die vergleichende Analyse von Phosphorylierungs-Stellen an niedrig exprimierten Komponenten einer Signalkaskade wie beispielsweise an Proteinen der Kinase-Familie ist allerdings eine große Herausforderung. Hierfür bedarf es der Etablierung neuer Ansätze zur spezifischen Protein-Reinigung mit der nachfolgenden Quantifizierung von Phosphorylierungs-Ereignissen. Die vorliegende Dissertation demonstriert zum ersten Mal die erfolgreiche Kombination einer Kinase-selektiven Affinitäts-Chromatographie mit der IMAC-basierten Anreicherung phosphorylierter Peptide und der Quantifizierung über iTRAQ™, um Kinasen der InlB-aktivierten c-Met-Signalkaskade zu charakterisieren.

Mit der Strategie der quantitativen Phosphokinom-Analyse konnten 166 Phosphorylierungs-Stellen an 106 humanen Kinasen identifiziert werden. Die iTRAQ™-basierte Quantifizierung führte zur Identifizierung InlB-induzierter posttranslational phosphorylierter Kinasen wie Erk1/2 und GSK3A/B, die bereits aus Studien der HGF/SF-aktivierten c-Met-Signalkaskade bekannt sind. Darüber hinaus konnten neun zusätzliche Kinasen zum ersten Mal in dieser Studie als InlB-Effektorproteine identifiziert werden. Ein Vergleich zum HGF/SF-stimulierten c-Met-Signalweg zeigte Unterschiede und Gemeinsamkeiten unter den modifizierten Kinasen nach HGF/SF und InlB-Stimulation.

Die vorliegende Studie bietet eine Strategie mit hohem Potential zur Charakterisierung pathologisch relevanter Signalwege an und ermöglicht neue Einblicke in die c-Met-Signalübertragung in der Wirt-Pathogen-Interaktion von *Listeria monocytogenes*.

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1.	Das Human-pathogene Bakterium <i>Listeria monocytogenes</i>	1
2.	Die c-Met-Signalkaskade	8
3.	Protein-Phosphorylierung in der Signaltransduktion	14
4.	Signaltransduktions-Analysen durch Methoden der Proteomforschung	18
II	Zielsetzung der vorliegenden Dissertation	28
III	Ergebnisse	30
1.	Eine Kinase-selektive Affinitäts-Reinigung für die quantitative Analyse differentieller Phosphorylierungen	30
2.	Die N-terminale Variante InlB ₃₂₁ als funktioneller c-Met-Ligand	48
3.	Quantitative Phosphokinom-Analysen im InlB ₃₂₁ -c-Met-Signalweg	54
4.	Quantitative Phosphokinom-Analysen im HGF/SF-c-Met-Signalweg	73
5.	InlB ₃₂₁ - und HGF/SF-induzierte Proteinregulationen in der c-Met-Signalkaskade	79
6.	Analysen zur Funktion der Kinase Nek9 im c-Met-Signalweg	83
IV	Diskussion	98
1.	Posttranslationale Modifikations-Analysen am humanen Kinom	98
2.	Kinasen in der InlB ₃₂₁ -stimulierten c-Met-Signalkaskade	108
3.	Die mitotische Kinase Nek9 im InlB ₃₂₁ -c-Met-Signalweg	119
4.	Imitiert InlB den Wachstumsfaktor HGF/SF?	125
V	Ausblick	128
VI	Zusammenfassung	132
VII	Material und Methoden	134
1.	Chemikalien, Reagenzien und Puffer	134
2.	Allgemeine biochemische Methoden	135
3.	Zellbiologische Arbeiten	140
4.	Rekombinante Proteine	142

5.	Westernblot-Analysen von Kinasen im c-Met-Signalweg	146
6.	Quantitative Phosphokinom-Analyse	147
7.	Untersuchungen zu Nek9	161
VIII	Anhang	169
1.	Abkürzungsverzeichnis	169
2.	Tabellen und Abbildungen	172
3.	Literaturverzeichnis	178
4.	Danksagung	194
IX	Sachregister	196
X	Curriculum Vitae	204

I Einleitung

1. Das Human-pathogene Bakterium *Listeria monocytogenes*

Das Pathogen *Listeria monocytogenes* wurde erstmals in einem wissenschaftlichen

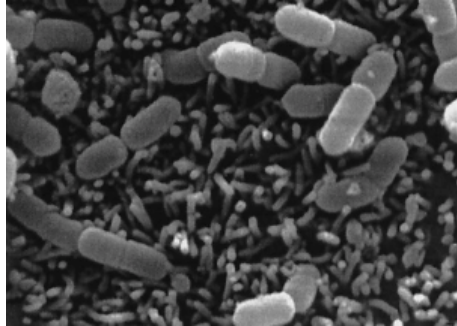


Abb. I.1: *Listeria monocytogenes* angeheftet an Microvilli von Caco 2-Zellen (Vazquez-Boland et al., 2001).

Bericht im Jahr 1926 als Erreger einer letalen Erkrankung in einer Hasenpopulation erwähnt. Da die Erkrankung von einer ausgeprägten Monocytose begleitet war, erfolgte die Klassifizierung dieses Pathogens als *Bakterium monocytogenes* (Murray et al., 1926). Nahezu zeitgleich wurde derselbe Erreger aus Wüstenrennmäusen isoliert, welche Symptome einer nekrotischen Leberinfektion aufwiesen. Eine zweite Klassifizierung als *Listerella hepatolytica*

erfolgte anschließend nach dem britischen Chirurgen Sir Joseph Lister (Pirie, 1927). 1940 änderte Pirie den Namen dieses Erregers schließlich in *Listeria monocytogenes* um. Seit 1948 wird *Listeria monocytogenes* in der 6. Edition des „Bergey's Manual of Determinative Bacteriology“ geführt (Breed et al., 1948).

Listeria spp. sind durch die Ausbildung von Flagellen bewegliche, fakultativ anaerobe Stäbchen-Bakterien, die weder Sporen noch Kapseln entwickeln. Die Stäbchen weisen einen Durchmesser von ca. 0.5µm und eine Länge von bis zu 1.5µm auf. Der Organismus ist ubiquitär verbreitet und kann aus Bodenproben, Oberflächen-Gewässern und Pflanzen isoliert werden. Bisher wurden *Listeria spp.* in 37 Säugetierarten, 17 Vogelarten, einigen Fischen und Schalentieren identifiziert. Der Genus *Listeria* zeichnet sich durch eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen Umwelteinflüsse aus. Der Organismus ist in der Lage, in einem Temperaturfenster von 1 °C bis 45 °C, unter hohen Osmolaritäten (bis zu 10% NaCl) sowie in einem breiten pH-Bereich (pH 4.3 bis pH 9.6) zu wachsen (Roberts und Wiedmann, 2003). Diese Eigenschaften stellen insbesondere eine Herausforderung an die Nahrungsmittelindustrie dar. Bisher wurde der Genus *Listeria* in sechs Arten eingeteilt: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* und *L. grayi*. *Listeria spp.* sind nahe verwandt mit *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* und *Staphylococcus*. Die hämolytischen Arten *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* zählen zu den enteroinvasiven Organismen dieses Genus. *L. monocytogenes* ist pathogen für Mensch und Tier, wohingegen *L. ivanovii* ein eher ökonomisches Problem in der Großtierzucht, aber keine bekannte Gefahr für den Menschen darstellt. *L. seeligeri*

wird aufgrund seiner genetischen Ausstattung ebenfalls zu den hämolytischen Arten gezählt, allerdings als avirulent betrachtet. Die avirulenten Arten der *Listeria spp.* leben saprobiontisch (zusammengefasst in Vazquez-Boland et al., 2001).

Im Jahr 2001 wurden die vollständig sequenzierten Genome des Pathogens *L. monocytogenes* und der apathogenen Art *L. innocua* publiziert. Das Genom von *L. monocytogenes* besteht aus ca. $3 \cdot 10^6$ bp und weist 2853 Protein-kodierende Gensequenzen auf. Im Vergleich mit *L. innocua* besitzt *L. monocytogenes* 270 Stamm-spezifische Gene (Glaser et al., 2001).

A. Listeriose

Die durch die opportunistisch pathogenen Arten verursachte Krankheit Listeriose tritt mit ca. zwei bis 15 Fällen je einer Millionen Einwohner selten auf. Die hohe Sterberate von 20 bis 30% der betroffenen Individuen zeigt jedoch die von *L. monocytogenes* ausgehende Gefahr (Hain et al., 2007). Immunkompetente Patienten haben meist Grippe-ähnliche Erscheinungen, wohingegen immunkompromittierte Träger des Erregers (AIDS-Patienten, Diabetiker, Schwangere, Säuglinge etc.) ein deutlich schwerwiegenderes Krankheitsbild aufweisen. Die Manifestierung der Listeriose reicht von Influenza-artigen Beschwerden über Gastroenteritis, Septicaemia, Abort bei Schwangeren und Abszessen bis zu schwerwiegenden Syndromen bei Neugeborenen (Granulomatosis Infantiseptica) (Doganay, 2003). Die Vielzahl an klinischen Erscheinungsformen spiegelt die Fähigkeit von *L. monocytogenes* wieder, drei Wirtszell-Barrieren zu durchbrechen (Magen-Darm-Barriere, Plazenta-Barriere, Blut-Hirn-Schranke). Je nach Infektionsart (orale bzw. parenterale Infektion) unterscheidet sich die LD₅₀ (Lethal-Dosis 50%) in Mäusen signifikant (oral: 10^9 Keime, parenteral: 10^5 - 10^6 Keime). Die minimale Dosis, die zum Ausbruch einer Infektion im Menschen nötig ist, konnte bisher noch nicht abgeschätzt werden (Vazquez-Boland et al., 2001). Antimikrobielle Chemotherapien wirken bei der Behandlung einer *listeriellen* Infektion nur suboptimal. Eine Erklärung hierfür ist die intrazelluläre Lebensweise des Erregers und die daraus resultierende verminderte Effizienz von Antibiotika. Klinische Isolate sprechen allerdings auf gängige Antibiotika an. Hochdosierte Ampicillin-Therapien in Kombination mit Gentamycin zeigen die beste Wirksamkeit (Hof et al., 1997). Die vom Robert-Koch-Institut im Dezember 2006 veröffentlichte Statistik vermeldet im Zeitraum 2001 bis 2005 1519 Listeriose-Fälle in Deutschland, wobei hiervon 32% in einer Meningitis resultierten (Robert Koch Institut, 2006).

B. Der Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes*

Der Infektionszyklus von *L. monocytogenes* wurde erstmals an der Makrophagen-Zelllinie J774 detailliert untersucht (Abb. I.2, Tilney und Portnoy, 1989). *Listeria* kann seine Aufnahme auch in nicht-professionell phagozytierende Zellen durch die Interaktion der Virulenzfaktoren Internalin (InlA) (Gaillard et al., 1991) und Internalin B (InlB) (Dramsi et al., 1995) mit spezifischen Oberflächenproteinen der Wirtszelle

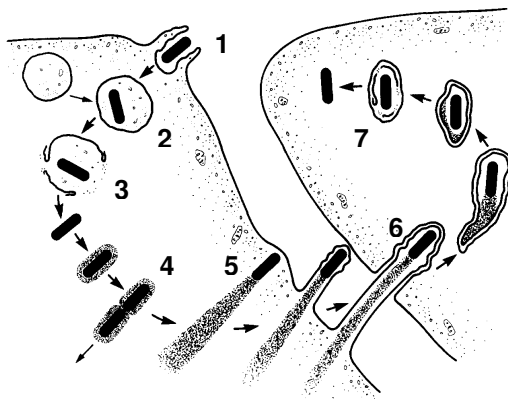


Abb. I.2: Schematische Darstellung des Infektionszyklus von *L. monocytogenes*. Die einzelnen Phasen sind im Text beschrieben (Tilney und Portnoy, 1989).

(1) über einen Reißverschluss-artigen Mechanismus (Zipper-Mechanismus) induzieren. Nach Phagozytose des Bakteriums, liegt es intrazellulär in einer Membran-Vakuole vor (2), die zu einem Phagosom reift. Das *listerielle* Poren-formende Zytotoxin Listeriolysin O (Geoffroy et al., 1987) perforiert die Membran des Phagosoms. Die als Proenzym synthetisierte und von der sekretierten Metalloprotease Mpl aktivierte

Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PlcA) degradiert die Lipid-haltige Membran des Phagosoms (3). Im Cytosol der Wirtszelle proliferiert *L. monocytogenes* (4) und rekrutiert über polar exprimiertes Zellwand-gebundenes ActA Proteine der wirtszelleigenen Aktinpolimerisations-Maschinerie. Durch diesen Prozess bilden sich bis zu 40µm lange Aktin-Schweife aus, die das Bakterium mit einer Geschwindigkeit von ca. 0.5µm/sec durch das Cytosol schieben (Dabiri et al., 1990) (5). Erreicht der Keim die zelluläre Peripherie, kann er in der Plasmamembran Finger-artige Protrusionen ausbilden, die von der Nachbarzelle aufgenommen werden (6). Durch die Expression von Listeriolysin O und der Phosphatidylcholin-abhängigen Phospholipase PlcB (Vazquez-Boland et al., 1992) wird die Doppelmembran des Sekundärphagosoms lysiert (7). Der Infektionszyklus beginnt an dieser Stelle von Neuem.

C. Die Familie der Internaline

Zur Familie der Internaline (Inl) werden seit Abschluss der Genomsequenzierung von *L. monocytogenes* 25 Gene gezählt, deren Genprodukte in Zellwand-gebundene und sekretierte Internaline unterteilt werden (Abb. I.3; Hamon et al., 2006). Alle Internaline besitzen eine charakteristische Domänen-Struktur: N-terminal befindet sich ein Export-vermittelndes Signal-Peptid (SP), gefolgt von einer unterschiedlichen

Anzahl von Leucin-reichen Sequenzen (LRR: Leucin-rich Repeats), die eine jeweils charakteristische Leucin-Signatur innerhalb von 22 AS langen Bereichen aufweisen. Die LRR-Module formen eine rechtshändige parallele β -Helix-Struktur und gelten

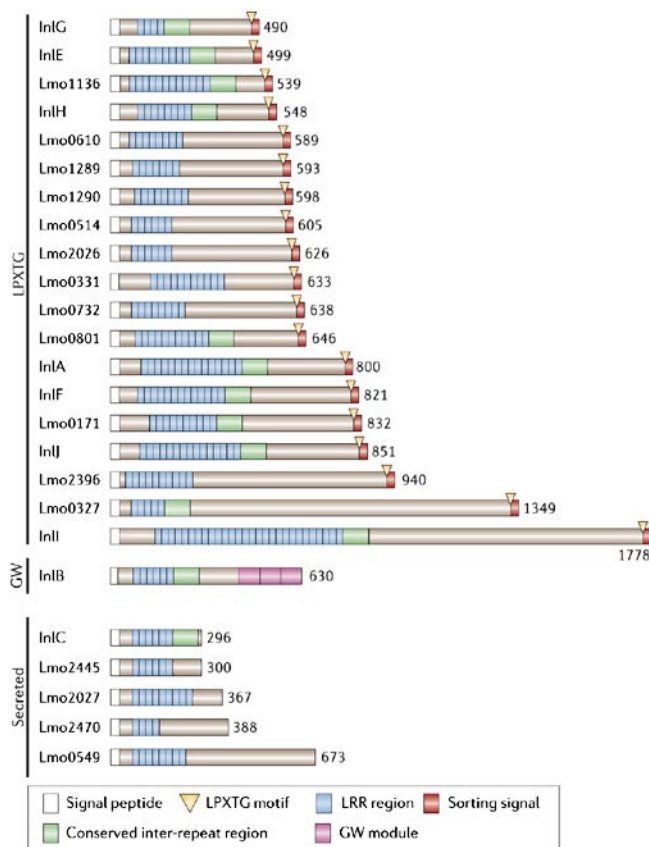


Abb. I.3: Schematische Darstellung der Proteine der Internalin-Familie (Hamon et al., 2006).

aus drei mit Glycin und Tryptophan beginnenden Modulen (GW-Module) ausgestattet, wodurch das Protein nicht-kovalent an die Lipoteichonsäure-Komponente der Zellwand geknüpft ist (Jonquieres et al., 1999; Braun et al., 1997). InlB ist auch als gelöster Faktor in bakteriellen Kulturüberständen nachweisbar (Trost et al., 2005; Jonquieres et al., 1999; Dramsi et al., 1995).

Die Proteine der Internalin-Familie und sämtliche weitere bekannten *listeriellen* Virulenzfaktoren sind chromosomal lokalisiert und in diskreten Einheiten organisiert. Das 9kbp große *Listeria Pathogenicity Island* (LPI-1) kodiert die sechs Virulenzgene *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB*. Die kodierenden Sequenzen der Multigenfamilie

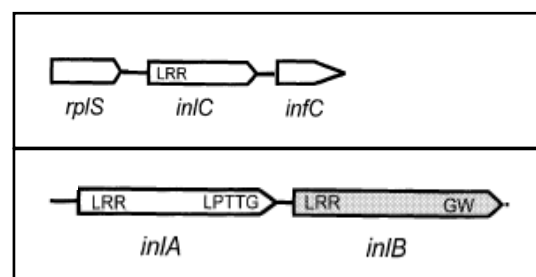


Abb. I.4: Die chromosomale Organisation der Virulenzgene *inlAB* und *inlC* (Kreft et al., 2002).

der Internaline sind in unterschiedlichen Einheiten organisiert. Die Gene für InlA und InlB sind im *inlAB* Operon zusammengefasst, wohingegen das Gen für das funktionell nicht charakterisierte InlC einen eigenen Promotor besitzt (Abb. 1.4; Kreft et al., 2002).

Die Promotoren der Virulenzgene von LIPI-1 und der meisten Gene der Internalin-Familie werden durch das *prfA*-Genprodukt (Positiv Regulator of Virulence Eaktor A) reguliert (Mengaud et al, 1991). Das 27kDa große Protein PrfA bindet über ein Helix-Turn-Helix-Motif an ein 14bp umfassendes zentrales Konsensus-Element (PrfA-Box) im jeweiligen Promotor. Zur vollen Aktivität benötigt PrfA wahrscheinlich einen Ko-Faktor bzw. eine posttranslationale Modifikation (Dickneite et al., 1998; Renzoni et al., 1997). Die Translation der mRNA für PrfA verläuft erst ab einer Temperatur von 37°C effizient, was die Anpassung von *L. monocytogenes* an die Körpertemperatur von Säugetieren widerspiegelt. Unterhalb von 30°C verhindert die Sekundärstruktur der mRNA eine Interaktion mit Ribosomen (Johansson et al., 2002).

D. Die Internalin B-vermittelte Invasion

Die Aufnahme in die Wirtszelle stellt den initialen Prozess des *listeriellen* Infektionszyklus dar (Abb. 1.2 (1)). Die Wechselwirkung von InlA zu dem Zelladhäsions-Molekül E-Cadherin bzw. von InlB zu der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met bewirkt eine lokale Zytoskelett-Reorganisation, die zur Internalisierung von *L. monocytogenes* in das Cytosol der Wirtszelle führt. Die InlA-E-Cadherin-Interaktion induziert eine Aufnahme hauptsächlich in Epithelzellen und es wird angenommen, dass diese Interaktion für die Überwindung des Darm-Epithels (Bierne und Cossart, 2002; Lecuit et al., 2001; Gaillard et al., 1991) und der plazentalen Barriere verantwortlich ist (Lecuit et al., 2004). InlB vermittelt die Aufnahme von *L. monocytogenes* in Hepatozyten, Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten (Greiffenberg et al., 1998; Parida et al., 1998; Dramsi et al., 1995; Lingnau et al., 1995). Im Mausmodell wurde gezeigt, dass die InlB-vermittelte Internalisation hauptsächlich in der Besiedlung von Leber und Milz eine Rolle spielt (Khelef et al., 2006; Dramsi et al., 2004). Neben c-Met (Shen et al., 2000) wurden zwei weitere Oberflächenproteine als Interaktionspartner für InlB identifiziert: der multifunktionelle und multikompartimentäre Rezeptor gC1q-R (Braun et al., 2000) und Glykosaminoglykane (GAGs) (Jonquieres et al., 2001).

gC1q-R

In Affinitäts-chromatographischen Studien wurde als erster eukaryotischer Interaktionspartner für InlB das ubiquitär exprimierte Membranprotein gC1q-R, identifiziert. Der 33kDa große Rezeptor gC1q-R bindet neben Thrombin, Vitronektin und anderen extrazellulären Liganden den globulären Anteil von C1q, der Hauptkomponente des Komplementsystems (Ghebrehiwet et al., 2001). InlB konkurriert mit C1q sowie mit einem α -gC1q-R-Antikörper um die Bindung an gC1q-R. In *in-vitro*-Infektionsassays wurde gezeigt, dass die InlB-gC1q-R-Interaktion einen positiven Einfluss auf die Invasionseffizienz von *L. monocytogenes* in Vero-Zellen hat. Da gC1q-R selbst keine Transmembran-Domäne besitzt, wird angenommen, dass dieses Protein eine Funktion als Ko-Rezeptor für c-Met ausübt (Braun et al., 2000). Die Bindung von InlB zu gC1q-R erfolgt über die GW-Module von nicht Zellwand-gebundenem InlB (Marino et al., 2002).

Glykosaminoglykane

Glykosaminoglykane (GAGs) sind negativ geladene, unverzweigte Polysaccharidketten aus heterogenen Disaccharid-Untereinheiten (Galaktose, Glukuronsäure, Glukosaminen, etc.). Gebunden an Matrix- und Transmembran-Proteine ergeben sich sog. Proteoglykane wie Heparansulfat-Proteoglykan. Glykosaminoglykane sind in allen eukaryotischen Zellen vorhanden. Mögliche Funktionen sind die Bevorratung bzw. die Diffusionskontrolle von Wachstumsfaktoren auf der Zelloberfläche über ionische Wechselwirkungen, sowie der Schutz von Wachstumsfaktoren vor extrazellulären Proteasen. Durch Oligomerisierung von Wachstumsfaktoren über die Interaktion mit GAGs tragen diese auch zur Potenzierung der Signalstärke von Wachstumsfaktoren bei (Sakata et al., 1997; Schwall et al., 1996; Zioncheck et al., 1995). Eine Verarmung der Zelle an GAGs führt zu einer Verringerung der InlB-induzierten Invasionseffizienz. GAGs führen zur lokalen Aggregation von InlB und tragen vermutlich dadurch zu einer verstärkten Signalwirkung bei. Die Bindung zu GAGs ist in Analogie zur Interaktion mit gC1q-R von den basischen GW-Modulen von InlB abhängig (Banerjee et al., 2004; Jonquieres et al., 2001).

c-Met

Die InlB-c-Met-Interaktion aktiviert die für die Invasion essentielle Tyrosin-Kinase-Domäne von c-Met (Shen et al., 2000) und nachfolgend die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) (Ireton et al., 1996) und den Ras-MAP-Kinase-Signalweg (Copp et al., 2003; Tang et al., 1998). Die InlB-induzierte c-Met-Signalkaskade resultiert in einer

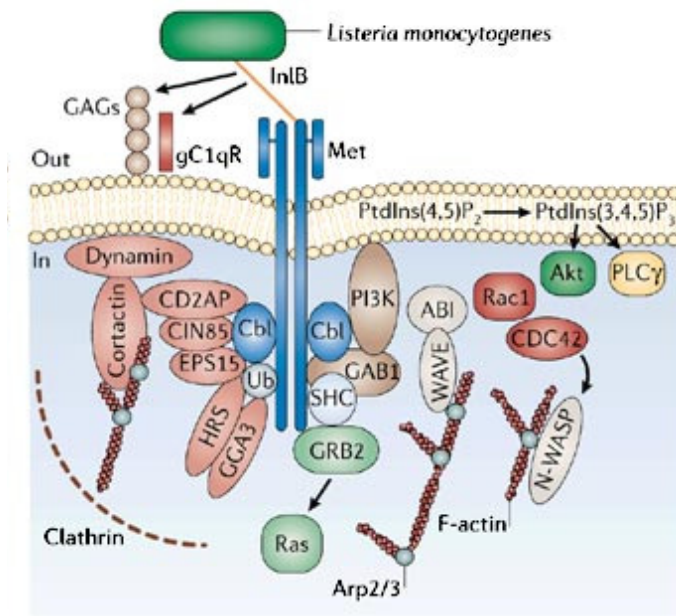


Abb. 1.5: InlB-aktivierte Komponenten der c-Met-Signalkaskade. InlB leitet den Umbau des lokalen Aktinzytoskeletts durch c-Met-abhängige Steuerung Aktin-regulierender Proteine wie Rac1, CDC42 und dem Arp2/3-Komplex ein (rechte Seite); an der Endozytose sind Clathrin-vermittelte Prozesse beteiligt (linke Seite) (Hamon et al., 2006).

lokalen Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts. InlB beeinflusst die Aktivität der kleinen GTPasen Rac1 und CDC42 und die Aktin-Nukleations-fördernden Proteine N-WASP und WAVE (Bosse et al., 2007; Bierne et al., 2005). Der Aktin-Nukleator-Komplex Arp2/3 wird durch InlB-Stimulation aktiviert und lokal zur *listeriellen* Eintrittsstelle rekrutiert (Abb. 1.5; Hamon et al., 2006). An der *listeriellen* Aufnahme ist die Clathrin-abhängige Rezeptor-Endozytose beteiligt (Veiga und Cossart, 2005). Dieser Prozess konnte mittlerweile auch für die Endozytose anderer Mikroorganismen gezeigt werden (Harvey et al.,

2001; Wyrick et al., 1989). Viele der bislang an der InlB-c-Met-vermittelten Invasion beteiligten charakterisierten Proteine haben eine fundamentale Bedeutung in der durch den physiologischen Liganden HGF/SF vermittelten c-Met-Signalkaskade. Eine grundlegende Frage ist somit, ob InlB das Wachstumshormon HGF/SF initiiert oder ob die Aktivierung von c-Met durch beide Liganden unterschiedliche Prozesse induziert. Die stetig neue Identifizierung von Proteinen und Mechanismen, die an der Endozytose des Pathogens beteiligt sind, zeigt die unvollständige Charakterisierung des c-Met-Signalweges. Die Identifizierung spezifischer Schlüssel-Proteine der c-Met-Signalkaskade steht im Fokus dieser Arbeit. In den folgenden Kapiteln werden der natürliche Ligand HGF/SF, der *listerielle* Virulenzfaktor InlB und c-Met beschrieben.

2. Die c-Met-Signalkaskade

A. Die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met/HGFR

Das Proto-Onkogen c-Met/HGFR (Hepatocyte Growth Factor Receptor) wird zur Gruppe der 58 Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) gezählt (Manning et al., 2002) und wurde erstmals 1984 in einer chemisch transformierten Osteosarcoma-Zelllinie als konstitutiv aktives Genprodukt TPR-Met identifiziert (Cooper et al., 1984). c-Met stellt den Prototyp einer kleinen Familie von heterodimeren Rezeptor-Tyrosinkinasen dar, dessen Homologe Ron und Sea in verschiedenen Vertebraten wie Maus, Ratte, Huhn und Frosch nachgewiesen wurden (Chan et al., 1988, Wallenius et al., 1997; Aberger et al., 1997; Thery et al., 1995). In den genetisch etablierten Modellsystemen *C. elegans* und *D. melanogaster* existiert keine c-Met-kodierende Gensequenz (Rubin et al., 2000). c-Met wird hauptsächlich in Zellen epithelialen und endothelialen Ursprungs exprimiert, wohingegen die Expression des physiologischen Liganden HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor) (Nakamura et al., 1989, Miyazawa et al., 1989, Zarnegar und Michalopoulos, 1989; Stoker et al., 1987) in Fibroblasten und Stroma-Zellen des dem Epithel bzw. Endothel unterliegenden Mesenchyms statt findet (Sonnenberg et al., 1993).

c-Met wird als glykosylierte 190kDa schwere Polypeptid-Kette translatiert. Die aktive heterodimere Form entsteht durch proteolytische Prozessierung durch die zelluläre Protease Furin zwischen R³⁰⁷ und S³⁰⁸ (Komada et al., 1993). Der extrazelluläre Anteil umfasst die Aminosäuren 25 bis 932 und besteht aus der gesamten α -Kette und einem Teil der β -Kette (Abb. I.6). Die α -Kette und die Aminosäuren 308 bis 514 der β -Kette bilden die in Homologie zu Semaphorinen bezeichnete Sema-Domäne, welche für die Rezeptor-Dimerisierung essentiell ist (Kong-Beltran et al., 2004). Die SEMA-Domäne besitzt eine Propeller-artige Struktur aus sieben Flügel-Einheiten (F1 bis F7). Über eine kleine Cystein-reiche Struktur (PSI) sitzt die Sema-Domäne auf den folgenden vier stielartigen Immunglobulin-Domänen (IgG1 bis IgG4). Im Anschluss an die vierte IgG-Domäne durchspannt die β -Kette die Plasmamembran (TM). Intrazellulär schließt sich die Juxtamembran-Domäne an (JM), die regulatorische Elemente enthält. C-terminal folgen die katalytische Kinase-Domäne (KD) und eine Substratbindestelle (SB) (Birchmeier et al., 2003).

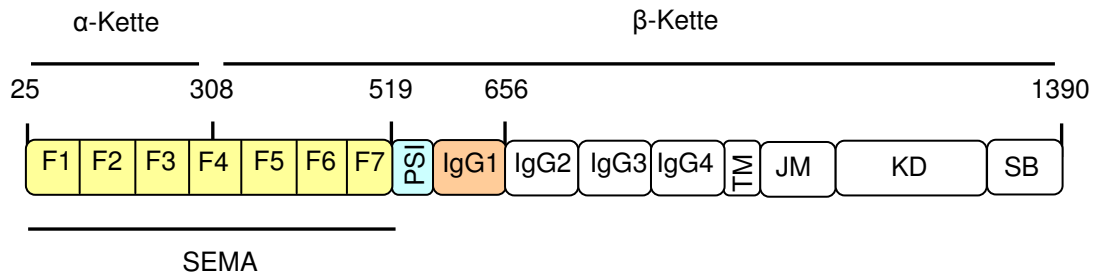


Abb. I.6: Domänen-Struktur der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met (F: Flügel; PSI: Cystein-reiche Domäne; IgG: Immunglobulin-artige Domäne; TM: Transmembran-Domäne; JM: Juxtamembran-Domäne; KD: Kinase-Domäne; SB: Substratbindung, modifiziert von Niemann et al., 2007).

Nach dem allgemeinen Verständnis zur Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen (Schlessinger, 2000) resultiert die Bindung des Liganden HGF/SF an c-Met in der Oligomerisierung mehrerer c-Met-Moleküle und der Trans-Autophosphorylierung der Tyrosine Y^{1234} und Y^{1235} in der Aktivierungs-Schleife der Kinase-Domäne. Die Phosphorylierung dieses Tyrosin-Paares korreliert mit der Aktivierung der Tyrosinkinase-Domäne von c-Met (Longati et al., 1994). Die C-terminal lokalisierte multifunktionelle Substratbindestelle ist konserviert unter den Homologen c-Met, Ron und Sea. Ein zweigeteiltes hydrophobes Motif innerhalb der Substratbindestelle umschließt die Tyrosine Y^{1349} und Y^{1356} . Die Phosphorylierung dieser Tyrosine generiert Bindestellen für SH2- und PTB-Domänen-besitzende Adapter- und Signalmoleküle wie Grb2, Gab1, p85-PI3K und p60Src (Ponzetto et al., 1994). Die direkte Interaktion zwischen c-Met und Adapter- bzw. Signalproteinen ermöglicht deren Rekrutierung an die Plasmamembran und eine c-Met-abhängige Tyrosin-Phosphorylierung. Die Endozytose von c-Met ist Clathrin-abhängig (Hoffmann et al., 2006) und Clathrin-RNAi-Experimente zeigen eine Reduktion der InlB-vermittelte Invasionseffizienz von *L. monocytogenes* (Veiga und Cossart, 2005). Mono-ubiquitinierung durch die Ubiquitin-Ligase Cbl führt c-Met dem proteasomalen Abbau zu (Jeffers et al., 1997). Neben dem proteasomalen Abbau markiert die Monoubiquitinierung c-Met für den Transport in frühen Endosomen (Carter et al., 2004) und eine weitergehende Signalübertragung aus dem Endosom heraus wird postuliert (Kermorgant und Parker, 2005).

B. c-Met-abhängige Signaltransduktion

Die evolutionär gesehen späte Entwicklung des Rezeptor-Liganden-Paares HGF/SF-c-Met und dessen Einzigartigkeit in Vertebraten zeigt die Bedeutung in der Entwicklung komplexer Organismen: die c-Met-Signalkaskade trägt während der

Embryogenese zur korrekten Organ- und Gewebeausbildung bei; in Adulten partizipiert c-Met an der Regeneration und Ausbildung verschiedener Organe (Leber, Blutgefäße, Haut, Plazenta) (Maulik et al., 2002). Auf zellulärer Ebene steuert die HGF/SF-aktivierte c-Met-Signalkaskade mitogene, motogene und morphologische Prozesse und beeinflusst sowohl Zell-Adhesion, die Transkription von Genen und die Dynamik des filamentösen Aktinzytoskeletts. Die strenge Regulation der nach Aktivierung von c-Met erforderlichen biologischen Antwort ist abhängig von Zelltyp, Zellzustand und Gewebetyp. Die c-Met-Signalübertragung reguliert die Aktivität und Lokalisation von Schlüsselkomponenten wie GTPasen (Rac1, CDC42), Kinasen (PI3K, MAPK, Src), Aktinzytoskelett-regulierenden Proteinen (Wave, Arp2/3), Transkriptionsfaktoren (ETS1, AP1) und Adapter-Proteinen (Grb2, Gab1) (Birchmeier, 2003). Als Ko-Rezeptoren für c-Met wurden die Membranproteine $\alpha_6\beta_4$ -Integrin, Semaphorin, Plexin B1, E-Cadherin und CD44 identifiziert (Maulik et al., 2002; Bertotti und Comoglio, 2003).

Die Funktion von HGF/SF als Scatter Factor wurde eingehend in MDCK-Zellen charakterisiert. Nach HGF/SF-Stimulation lösen sich einzelne Zellen durch Unterbrechung von Zell-Zell-Kontakten aus dem epithelialen Zellverband heraus und beginnen, sich über das Substrat zu bewegen. Die motorische Kraft für die Bewegung liefert der Auf- und Abbau des filamentösen Aktinzytoskeletts. Der Prozess des „Scatterings“ wird durch Inhibierung des PI3-Kinase- und des MAP-Kinase-Signalweges wie auch durch Vorbehandlung der Zellen mit Proteasom-Hemmern unterbunden (Potempa und Ridley, 1998). Neben der zweidimensionalen Bewegung löst HGF/SF in MDCK-Zellen das Einwandern in eine dreidimensionale Kollagen-Matrix und die Bildung von verzweigten Röhrenstrukturen aus (Birchmeier et al., 2003).

Die Fehlregulation c-Met-abhängiger Prozesse kann zur Transformation von Zellen zu Krebszellen und zur Metastasierung führen. In einer Vielzahl maligner Tumoren (Nierenkarzinom, Osteosarcom, Glioblastom, etc) wurde eine Fehlfunktion von c-Met selbst oder dessen Liganden nachgewiesen, die aus der Überexpression von c-Met und HGF/SF, einer konstitutiven Aktivierung der c-Met-Kinase-Domäne oder aus einer Dysfunktion der Rezeptor-Endozytose (Überblick in Birchmeier et al., 2003) resultierte. Zukünftige therapeutische Ansätze zielen auf die antagonistische Wirkung von modifizierten Liganden (NK4, Matsumoto und Nakamura, 2005) und Antikörpern (5D5, Genentech; AMG102, Amgen, Klinische Phase 2) ab, die c-Met oder HGF/SF binden und eine Aktivierung der Signalkaskade verhindern. Eine weitere Strategie umfasst die Entwicklung niedermolekularer c-Met-spezifischer Kinase-Inhibitoren wie XL880 (Exelixis, klinische Testphase II) und SGX523 (SGX Pharmaceuticals, vorklinische Testphase).

C. Die c-Met-Liganden InlB und HGF/SF

HGF/SF und InlB haben keinerlei Sequenz-Ähnlichkeiten und sind strukturell sehr unterschiedlich. Der schematische Aufbau der Domänenstruktur ist in Abb. I.7 dargestellt. HGF/SF wird als 728 Aminosäure lange biologisch inaktive Form translatiert und extrazellulär von der Protease uPA (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator) prozessiert. (Naldini et al., 1992). Aktives HGF/SF besteht aus einer 69kDa schweren α -Kette und einer 34kDa schweren β -Kette. Die α -Kette beginnt mit einer N-terminalen Domäne gefolgt von vier Kringel-artigen Modulen (K1 bis K4). Die β -Kette hat eine hohe Struktur-Ähnlichkeit zu der katalytischen Domäne der Chymotrypsin-artigen Serinproteasen (SP), besitzt jedoch keine enzymatische Aktivität (Kirchhofer et al., 2004).

Der Virulenzfaktor InlB beginnt N-terminal mit einer Cap-Domäne, gefolgt von sieben Leucin-reichen Sequenzbereichen und einer Inter-Repeat-Domäne. C-terminal folgen ein kurzer B-Repeat und drei 80 Aminosäure-lange GW-Module (Marino et al., 2002; Schubert et al., 2001).

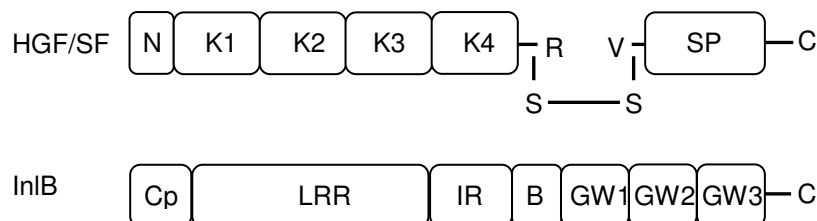


Abb. I.7: Schematischer Aufbau der c-Met-Liganden HGF/SF und InlB (Cp: Cap-Domäne; LRR: Leucin-reiche Sequenzen; IR: Inter-Repeat; B: B-Repeat; GW: GW-Module; N: N-terminale Domäne; K: Kringel-Domänen; SP: Serinprotease-Homologie-Domäne; nach Bierne und Cossart, 2002).

Die Interaktionsflächen der beiden Liganden zu c-Met sind in Abb. I.8 dargestellt. Die InlB-c-Met-Bindung beruht auf der Wechselwirkung der LRR-Domänen mit der ersten Immunglobulin-artigen c-Met-Struktur (IgG1). Der Inter-Repeat (IR) bindet an die Flügel F4 bis F6. Beide Interaktionen sind nötig, um die flexible SEMA-Domäne von c-Met in eine rigide Struktur zu zwingen. Es wird vermutet, dass hierdurch die Oligomerisierung von c-Met ermöglicht wird (Niemann et al., 2007). Die hochaffine HGF/SF-Bindung zu c-Met erfolgt über die N-terminale Domäne und über die erste Kringel-Struktur. Sowohl N, K1 und SP binden an die SEMA-Domäne, wobei nur für

SP die exakte Interaktion zu den Flügel-Strukturen F2 und F3 bekannt sind. Eine Interaktion zu IgG1 wie im Falle von InIB ist nicht bekannt (Holmes et al., 2007; Stamos et al., 2004). Beide Liganden besitzen Bindungsaffinitäten zu Glykosaminoglykanen (GAGs), wobei für HGF/SF die physiologische Bedeutung der Bindung zu GAGs nicht vollständig verstanden ist. Die InIB-GAG-Interaktion verstärkt die Invasion von *L. monocytogenes* in die Wirtszelle (Banerjee et al., 2004; Jonquieres et al., 2001). InIB wechselwirkt zusätzlich mit dem Komplement-Rezeptor gC1q-R (Braun et al., 2000).

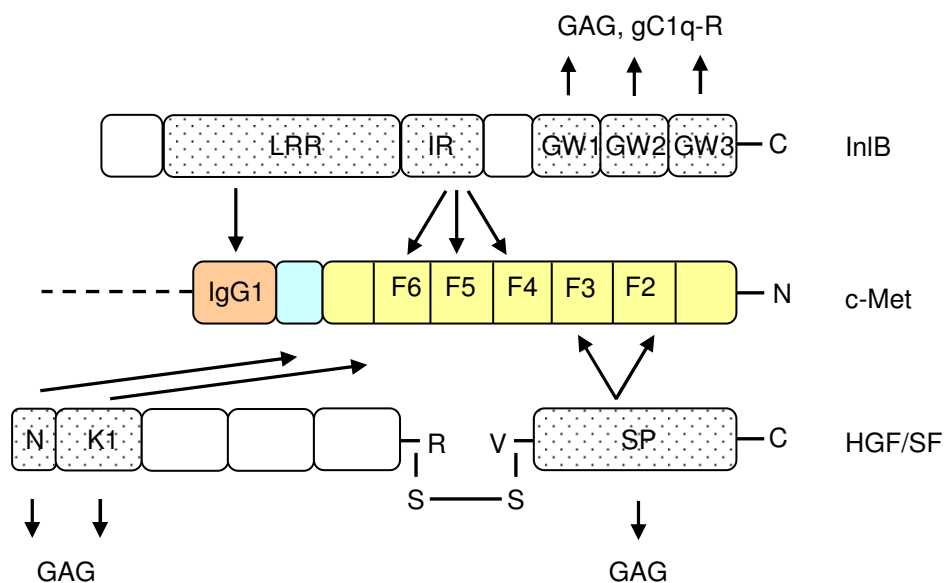


Abb. I.8: Interaktionsflächen von HGF/SF bzw. InIB zu c-Met (LRR: Leucin-reiche Sequenzen; IR: Inter-Repeat; GW: GW-Module; N: N-terminale Domäne; K: Kringel-Domänen; SP: Serinprotease-Homologie-Domäne; F: Flügel; GAG: Glykosaminoglykane; gC1q-R: Komplement-Rezeptor für C1Q).

Die Bindung an und die Aktivierung von c-Met und der nachfolgenden Signalübertragung durch HGF/SF bzw. InIB ist bislang nur unvollständig charakterisiert. Funktionelle Studien zeigen, dass nach Stimulation mit äquivalenten Mengen beider Liganden eine ähnlich intensive c-Met-Autophosphorylierung induziert wird. Darüber hinaus stimulieren sowohl HGF/SF als auch InIB Zellmigration (Banerjee et al., 2004; Shen et al., 2000) und DNA-Synthese (Niemann et al., 2007). Außerdem bewirkt eine externe HGF/SF-Zugabe eine Rekonstitution der Invasion von *L. monocytogenes* EGD ($\Delta inIB$) in Vero Zellen (Banerjee et al., 2004). Im Vergleich zu HGF/SF konnten trotz ähnlicher c-Met-Aktivierung allerdings auch

quantitative Unterschiede in der Aktivierung des MAP-Kinase- und des PI3K-Signalweges zugunsten von InlB charakterisiert werden (Copp et al, 2003).

Die zur c-Met-Aktivierung minimale InlB-Sequenz besteht aus den Aminosäuren 36 bis 321 (InlB₃₂₁) und umfasst die N-terminale Cap-Domäne, die Leucin-reichen Sequenzbereiche und den Inter-Repeat. Die strukturelle Bestätigung hierfür erbrachten die Studien von Niemann (Niemann et al., 2007). Die direkte Interaktion zwischen c-Met und InlB hängt maßgeblich von fünf aromatischen Aminosäuren in den Leucin-reichen Sequenzbereichen ab (Abb. I.9). Ein Austausch dieser Aminosäuren zu Serin verhindert die Bindung und Aktivierung von c-Met vollständig (Machner et al., 2003).

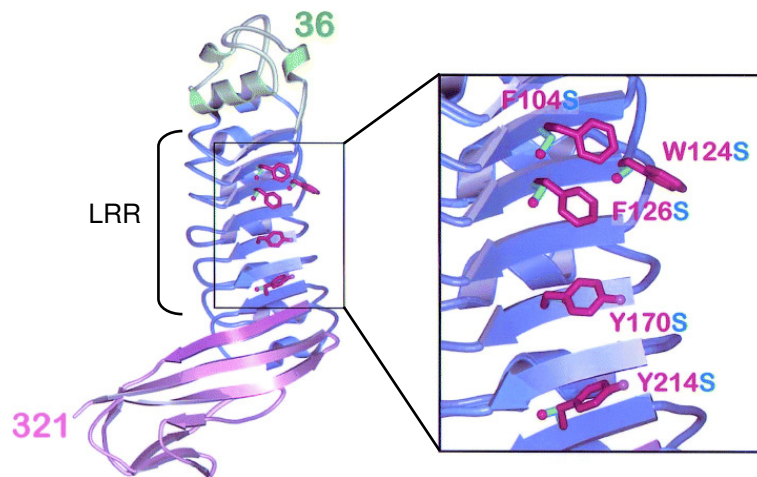


Abb. I.9: Fünf aromatische Aminosäuren in InlB₃₂₁ sind essentiell für die Aktivierung von c-Met. Ein Austausch dieser in den Leucin-reichen Sequenzbereichen (LRR) lokalisierten Aminosäuren zu Serin verhindert eine Bindung von InlB₃₂₁ an die Rezeptor-Tyrosinkinase (Machner et al, 2003).

3. Protein-Phosphorylierung in der Signaltransduktion

A. Phosphat-Transfer als regulatorisches Element

Ein fundamentaler Regulationsmechanismus in der Signalübertragung ist die posttranslationale Proteinmodifikation (PTM). Neben proteolytischer Prozessierung von Proteinen kommt u.a. der Übertragung elektrophiler Moleküle eines Ko-Substrates auf eine nukleophile, elektronenreiche Aminosäure-Seitenkette eines Polypeptids eine bedeutende Rolle zu. *In-vivo* konnten bislang über 200 unterschiedliche Arten von Aminosäure-Modifikationen nachgewiesen werden, wobei von den wenigsten deren Funktion bekannt ist (Krishna, 1997). Für 15 der 20 proteinogenen Aminosäuren sind Modifikationen nachgewiesen und mindestens 5% des Genoms höherer Eukaryoten kodiert Enzyme, die solche Proteinmodifikationen katalysieren können. Zu den fünf häufigsten in Proteinen auftretenden PTMs werden Acetylierung, Alkylierung, Glykosylierung, Oxidation und Phosphorylierung gezählt (Walsh et al., 2005).

Schätzungsweise 30% aller Proteine eines eukaryotischen Proteoms sind transient phosphoryliert (Zolnierowicz und Bollen, 2000). Die kovalente Übertragung der endständigen Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) erfolgt in Eukaryoten

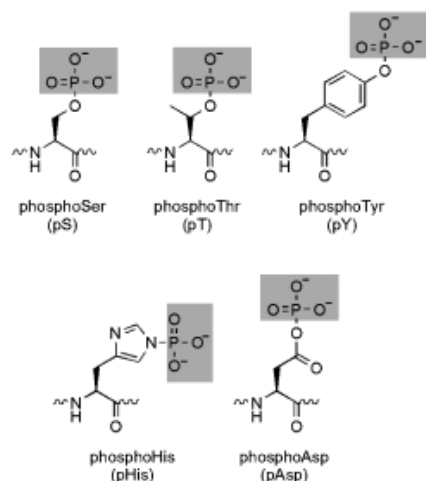


Abb. I.10: Phosphorylierte Formen der Aminosäure-Seitenketten von Serin, Threonin, Tyrosin, Histidin und Asparaginsäure. Je Phosphatrest werden zwei negative Ladungen auf eine neutrale Aminosäure übertragen (Walsh et al., 2005).

auf die Hydroxyl-Seitengruppe der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin. Selten findet man auch Phosphat-Übertragung auf Arginin, Histidin, Asparagin- und Glutaminsäure, wobei diese Modifikation vor allem in Prokaryonten und Pilzen regulatorische Funktionen in der Signalübertragung übernehmen (Hoch, 2000). Die Verteilung von phosphoryliertem Serin (pS) zu phosphoryliertem Threonin (pT) zu phosphoryliertem Tyrosin (pY) in Vertebraten verhält sich ca. 90:10:0.5 (Mann et al., 2002). Die Einführung der tetrahedralen Phosphat-Gruppe mit einer Säurekonstante (pK_a) von 6.7 in eine neutrale Akzeptor-Aminosäure bringt bei physiologischem pH-Wert zwei negative Ladungen in das Protein ein (Abb. I.10). Häufig treten Phosphorylierungen in Sequenzbereichen mit benachbarten

kationischen Argininen auf. Durch elektrostatische Wechselwirkungen und die Ausbildung von Wasserstoffbrücken über die vier Sauerstoffatome des übertragenen

Phosphatrestes beeinflusst die Phosphorylierung die Konformation eines Proteins. Multiple Phosphorylierungen sind ein häufig beobachtetes regulatorisches Element zur Steuerung von Proteinaktivität (Cohen, 2000). Je nach Lage und Anzahl der Phosphat-Übertragungen auf ein Protein tritt eine grundlegende oder eine nur lokal wirkende dreidimensionale Restrukturierung ein.

Neben dem Einfluss einer Phosphatgruppe auf die Proteinstruktur regulieren phosphorylierte Aminosäuren intermolekulare und intramolekulare Protein-Interaktionen. Sowohl die phosphorylierte Aminosäure als auch die flankierende Polypeptid-Sequenz und die respektive Erkennungs-Domäne im selben oder einem interagierenden Protein entscheiden über die Spezifität der Interaktion. Zu pS/pT-Interaktions-Domänen zählen u. a. 14-3-3-, Polo-Box-, WW-, WD40- und FHA-Domänen. Für phosphorylierte Tyrosine ist die Bindung u. a. an SH2- und PTB-Domänen beschrieben (Seet et al., 2006; Pawson und Nash, 2003).

Die Protein-Phosphorylierung ist ein reversibler Prozess und wird durch die antagonistische Aktivität von Protein-Phosphatasen und -Kinasen reguliert. Kinasen (Phospho-Transferasen) übertragen die Phosphatgruppe auf die Akzeptor-Aminosäure. Die Hydrolyse der unter physiologischen Bedingungen äußerst stabilen Phosphatesterbindung wird von Phosphatasen (Phosphohydrolasen) katalysiert. Ungefähr 2% des humanen Genoms kodieren ca. 100 Phosphatasen und ca. 500 Kinasen (Venter et al., 2001).

B. Kinasen - Schlüsselproteine in der Signaltransduktion

Der Kinase-katalysierte Phosphat-Transfer reguliert die Funktion und Lokalisation unterschiedlichster Substratproteine (Transkriptionsfaktoren, Enzyme, Struktur- und Transportproteine) und beeinflusst somit das gesamte Verhalten einer Zelle. Eine Klassifizierung erfolgt zunächst nach Akzeptor-Aminosäure in Ser/Thr-, Tyr- und His-Kinasen. Bereits in der Endphase der vollständigen Dekodierung des humanen Genoms im Jahr 2002 wurde die bislang umfassendste Auflistung humaner Kinasen veröffentlicht und der Begriff „humanes Kinom“ geprägt (Manning et al., 2002). Das humane Kinom umfasst 518 putative Proteinkinase-kodierende Gensequenzen, die sich aus 478 eukaryotischen Proteinkinasen (ePK) und 40 atypischen Proteinkinasen (aPK) zusammensetzen. aPKs zeigen biochemische Aktivität, obwohl sie keinerlei Sequenzähnlichkeit zu konservierten Kinase-Domänen aufweisen. Sequenz-Analysen der ATP-Bindetasche, der Substrat-Bindetasche und der katalytischen Domäne eukaryotischer Kinasen führten zur weiteren Einteilung in acht Gruppen und 134 Familien (Abb. I.11; Manning et al., 2002; Hanks und Hunter 1995).

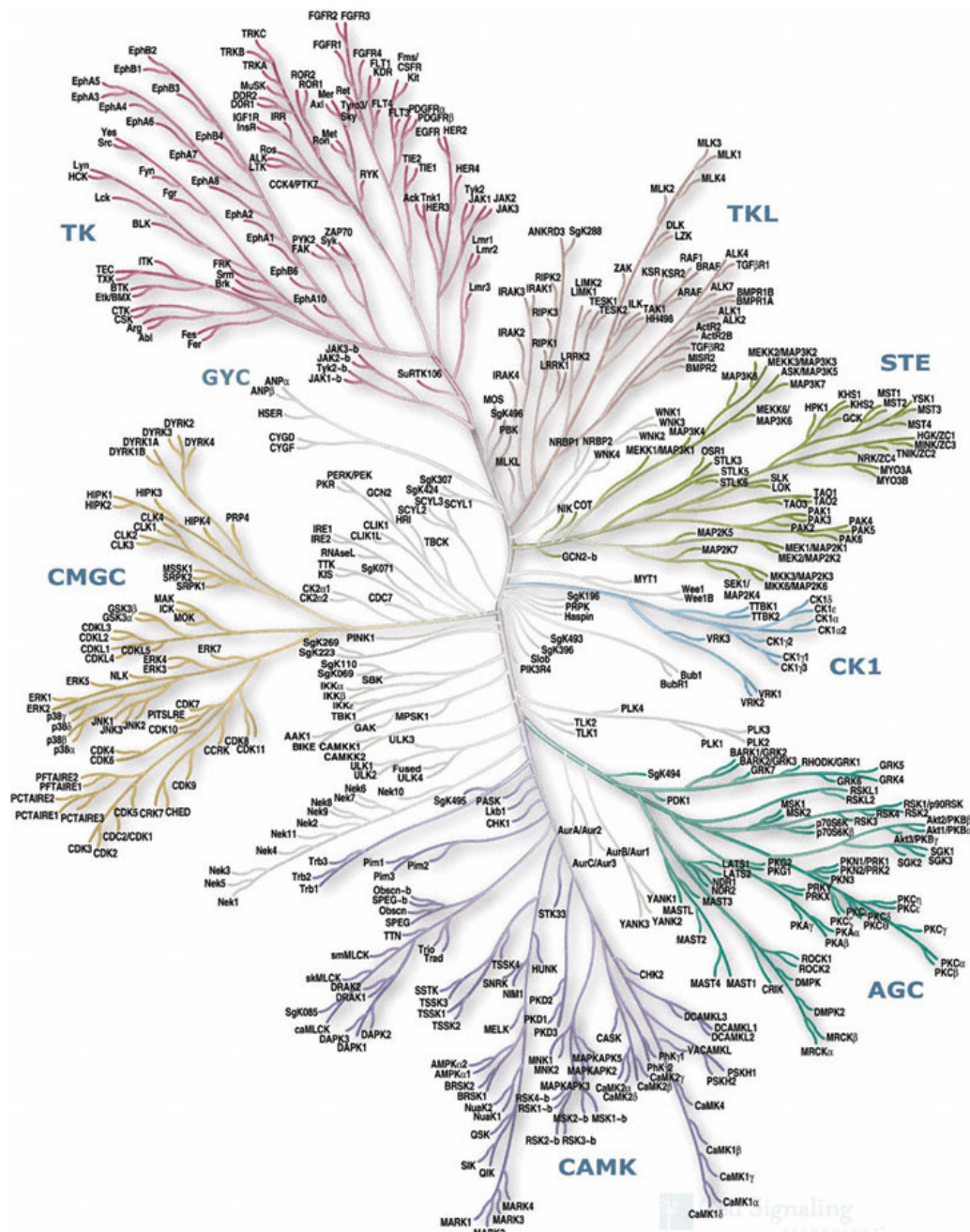


Abb. I.11: Phylogenetisches Dendrogramm der 478 typischen Proteinkinasen. Der Abstand zwischen zwei Kinasen ist proportional zu deren Sequenzidentität (TK: Tyrosin-Kinasen; TKL: Tyrosin-Kinase-Ähnliche; STE: STE-Kinase-Familie; CK1: Casein-Kinase-1-Gruppe; AGC: PKA/PKG/PKC-Kinasen; CAMK: Cam-Kinase-Familie; CMGC: CDK/MAPK/GSK3/CLK-Kinasen; Manning et al., 2002).

Verschiedene Online-Werkzeuge wie Scansite (Obenauer et al., 2003) und NetPhosK (Blom et al., 2004) ermöglichen die Vorhersage einer Kinase für eine bestimmte Phosphorylierungs-Stelle in einem Substratprotein. Über eine Positionsspezifische Bewertungsmatrix werden zu untersuchende Proteinsequenzen mit

bekannten Kinase-Substrat-Konsensus-Sequenzen verglichen. Mögliche Phosphorylierungs-Stellen und dafür in Frage kommende Kinasen werden vorgeschlagen und bewertet. Zusätzliche Informationen wie die Abschätzung der Oberflächen-Zugänglichkeit über Aminosäure-Eigenschaften werden z. T. mit berücksichtigt. Zum jetzigen Zeitpunkt sind Konsensus-Motife für nur ca. 5% aller Kinasen des humanen Kinoms erfasst. Da die Regulation der Kinase-Aktivität oftmals selbst vom Phosphorylierungs-Status dieser Proteine abhängig ist und bisherige Vorhersage-Möglichkeiten unzureichend sind, ist die Etablierung methodischer Verfahren zur Charakterisierung von Phosphorylierungen an Kinasen unerlässlich, um Signalkaskaden detailliert zu verstehen.

4. Signaltransduktions-Analysen durch Methoden der Proteomforschung

Das humane Genom umfasst ca. 30.000 Protein-kodierende Gensequenzen, wohingegen man die tatsächliche Anzahl an möglichen Proteinvarianten um einen Faktor fünf bis zehn höher schätzt (Venter et al., 2001). Diese Diversität ergibt sich durch Alternatives Spleißen und PTM. Man nimmt an, dass das Proteom einer eukaryotischen Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt ca. 10^4 verschiedene Proteinspezies umfasst. Die Spanne zwischen niedrig- und hochexprimierten Spezies wird auf ca. 10^5 - 10^7 Größenordnungen geschätzt. An der Übertragung von Signal-Ereignissen beteiligte Proteine wie Kinasen, Phosphatasen, GTPasen oder Transkriptions-Faktoren zählen im Vergleich zu den Haushalts-Proteinen einer Zelle zu den niedrig exprimierten Proteinen. Steht die Charakterisierung von Phosphorylierungen an solchen Proteinen im Vordergrund, ergeben sich neben der geringen Kopienzahl weitere die Analyse erschwerende Limitierungen. Hierzu zählen die Heterogenität und die stöchiometrischen Verhältnisse der Phosphorylierungen einer Proteinspezies: viele Proteine übernehmen in einer Zelle parallele Funktionen, weshalb man von einem unterschiedlichen Phosphorylierungs-Muster in einer Proteinspezies ausgehen kann. Darüber hinaus nimmt man an, dass nur eine kleine Fraktion einer Spezies zu einem bestimmten Zeitpunkt Phosphorylierungen trägt (Mann et al., 2002). Die systematische Analyse von Phosphorylierungen an Proteinen in der Signalübertragung erfordert deshalb die Entwicklung neuer methodischer Vorgehensweisen, die (i) die Anreicherung der zu analysierenden Proteine, (II) die Identifizierung von Phosphorylierungen an dieser Protein-Gruppe und (III) deren Quantifizierung erlauben.

A. Die Charakterisierung von Protein-Phosphorylierungen

Die Proteomforschung ermöglicht die Identifizierung von Phosphorylierungen in komplexen Proben nach Vortrennung der Proteine in geeigneten elektrophoretischen oder chromatographischen Systemen. Die hochauflösende zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) erlaubt in Kombination mit $^{32}\text{P}/^{33}\text{P}$ -Markierung, Westernblot-Analysen mit Phospho-Aminosäure-spezifischen Antikörpern oder Phosphat-spezifischen Färbungen wie Pro-Q[®] Diamond (Invitrogen) die Detektion phosphorylierter Proteine (Reinders und Sickmann, 2005). Sowohl Färbungs- als auch Markierungsmethoden sind kompatibel mit der massenspektrometrischen Analyse und ermöglichen in der Regel eine Protein-Identifizierung. Die Anwendung der 2DE in Kombination mit der Pro-Q[®] Diamond-Färbung führte zur erfolgreichen Identifizierung differentiell phosphorylierter Proteine nach HGF/SF- und InIB-Stimulation von HeLa S3-Zellen (Reinl, 2004). Die Westernblot-Analyse nach

Trennung einer Protein-Mischung in der 2DE ist ähnlich sensitiv wie die Radioaktiv-Markierung. Phosphotyrosin-spezifische Antikörper ermöglichen eine Visualisierung pY-tragender Proteine auf einer Membran bis zu einer Detektionsgrenze von wenigen Femtomol (Wang, 1988). Phosphoserin- und Phosphothreonin-spezifische Antikörper sind eher ungeeignet, da pS und pT schwache Epitope für die Immunisierung darstellen und die Spezifität dieser Antikörper nicht ausreichend ist. Eine Kompatibilität zur anschließenden massenspektrometrischen Analyse ist nach Westernblot-Analyse nicht mehr gegeben.

Verfahren, welche die 2DE in Kombination mit radioaktiv markiertem ATP oder Phosphatgruppen-spezifischen Farbstoffen nutzen, erlauben zwar eine Visualisierung phosphorylierter Proteine, eine exakte Zuordnung der Modifikation zu einer oder mehreren bestimmten Aminosäuren ist allerdings kaum möglich. Zur Identifizierung werden Proteine aus dem PA-Gel ausgeschnitten und durch Behandlung mit einer Protease verdaut. Mittels massenspektrometrischer Verfahren werden anschließend die resultierenden Peptide des Proteinverdaus sequenziert, wodurch eine Proteinidentifizierung möglich wird. Aufgrund des geringen Anteils modifizierter Peptide im Vergleich zu nicht-modifizierten Peptiden in einem Proteinverdaus ist die Wahrscheinlichkeit zur Sequenzierung eines phosphorylierten Peptides äußerst gering. Hinzu kommt die sog. Ionensuppression phosphorylierter Peptide, welche im positiven Modus eines Massenspektrometers weniger gut ionisierbar sind als nicht-phosphorylierte Peptide (Mann et al., 2002). Ein vielversprechender Ausweg zur erfolgreichen Identifizierung von Phosphorylierungs-Stellen in einem Protein ist die Anreicherung phosphorylierter Peptide aus einer komplexen Peptidmischung nach enzymatischem Verdau. Hierfür wurden u. a. die chemische Modifikation, die Immunopräzipitation (IP) und Affinitäts-chromatographische Verfahren vorgeschlagen.

Aus bereits beschriebenen Gründen eignet sich die IP nur für pY-haltige Peptide und stellt aufgrund der benötigten Antikörper-Qualität und -Menge eine relativ teure Methode dar. Standardisierte chemische Modifikationen phosphorylierter Peptide im Gegensatz dazu erlauben den Zugriff auf pS- und pT-haltige Peptide. Unter stark alkalischen Bedingungen konvertieren phosphorylierte Serine und Threonine zu Dehydroalanin und Dehydroamino-Buttersäure (β -Eliminierung) und können anschließend spezifisch (Michael-Addition) mit einem Biotin-Molekül markiert werden, welches zur Anreicherung über Avidin-Säulen geeignet ist. Die Stabilität des aromatischen Rings in Phosphotyrosin verhindert die β -Eliminierung. Aufgrund des Massen-Unterschiedes der eingeführten Gruppe kann die ursprünglich phosphorylierte Aminosäure indirekt nachgewiesen werden (Oda et al., 2001). Chemische Modifikationen, die die simultane Anreicherung von pS-, pT- und pY-

haltigen Peptiden erlauben, wurden mittlerweile ebenfalls entwickelt. Die Reaktion des Phosphatrestes mit SH-Gruppen-haltigen Komponenten über Phosphoamidbindungen erlaubt die kovalente Verknüpfung phosphorylierter Peptide an geeignete stationäre Phasen. Nach ausführlichen Waschschritten werden die gebundenen phosphorylierten Peptide durch Zugabe von Säure eluiert. Allerdings setzt eine solche Methode die vollständige Blockierung aller Amino- und Carboxylgruppen voraus (Zhou et al., 2001).

Eine Alternative zu den bisher beschriebenen Verfahren stellt die Affinitäts-Chromatographie über immobilisierte Metall-Ionen dar (IMAC, Immobilized Metal Affinity Chromatographie). Das Prinzip beruht auf der elektrostatischen Interaktion der beiden negativ geladenen Sauerstoff-Atome des Phosphatrestes mit immobilisierten positiv geladenen zwei-, drei- oder vierwertigen Metall-Ionen (Andersson und Porath, 1986). Die Bindung der Metall-Ionen an eine Matrix erfolgt über Iminodiacetat (IDA), Nitrilacetat (NTA) oder Tris-(carboxymethyl)-ethylendiamin

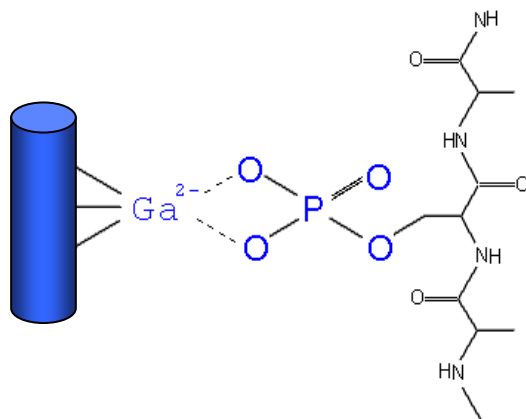


Abb. I.12: Das Prinzip der IMAC-Chromatographie. Schematische Darstellung der Chelatbindung von trivalentem Gallium mit den negativ geladenen Sauerstoffatomen der Phosphatgruppe von phosphoryliertem Serin; die Gallium-Ionen sind an einem Träger immobilisiert.

(TED). Verschiedene immobilisierte Metall-Ionen wie Fe^{3+} , Ga^{3+} , Al^{3+} und Zr^{4+} werden erfolgreich zur Anreicherung eingesetzt, wobei Fe^{3+} und Ga^{3+} die größte Bedeutung zukommt (Reinders und Sickmann, 2005). Die Komplexbildung zwischen Metall-Ionen und Phosphatresten phosphorylierter Peptide ist unter sauren Bedingungen stabil und ermöglicht das Auswaschen nicht-phosphorylierter Peptide mit anschließender basischer Elution der Phosphopeptide. Ein Nachteil dieser Methode ist die unselektive Bindung von sauren Peptiden. Die negativ

geladenen Carboxylgruppen von Asparagin- und Glutaminsäure können ebenfalls eine Wechselwirkung mit den positiv geladenen Metall-Ionen eingehen (Haydon et al., 2003; Stensballe et al., 2001). Eine vorherige chemische Derivatisierung von Carboxylgruppen zu Methylestern durch die wasserfreie Umsetzung mit methanolischer Salzsäure minimiert die unselektive Anreicherung saurer Peptide über das IMAC-Verfahren (Haydon et al., 2003; Ficarro et al., 2002). Neben der IMAC-Technologie etabliert sich zunehmend die Anreicherung von Phosphopeptiden über Metall-Oxide (MOAC, Metal Oxide Affinity Chromatography) wie Aluminium, Zirkonium und Titan (Larsen et al., 2005; Sano und Nakamura, 2004a; Sano und Nakamura, 2004b). Die kovalente Bindung der oxidierten Metall-Ionen an das Harz

soll das bei IMAC gelegentlich auftretende Ausbluten der Säulen umgehen und eine geringere Affinität für saure Peptide besitzen. Direkte Vergleiche zwischen IMAC und MOAC wurden bislang noch nicht publiziert.

Die Zuordnung der exakten Modifikationsstelle in angereicherten Phosphopeptid-Mischungen ist durch massenspektrometrische Verfahren wie CID (Collision Induced Dissociation) oder PSD (Post Source Decay) möglich. Für die Analyse werden sowohl MALDI-MS (Kusmann et al., 1999) wie auch ESI-MS (Resing et al., 1995) eingesetzt. Die entscheidenden Vorteile des ESI-MS gegenüber dem sensitiveren MALDI-MS liegen in der schonenderen Ionisierung und der Möglichkeit zur online-Kopplung an eine LC-Anlage. Durch Abgleich der Peptid-Muttermasse und der Massen der zugehörigen Fragmentationen mit theoretisch ermittelten Massen einer Datenbank über spezielle Algorithmen (Mascot, Sequest) lässt sich das Peptid eindeutig identifizieren. Da die Fragmentierung phosphorylierter Serine, Threonine und Tyrosine ein spezifisches Fragmentmassen-Muster hinterlässt, wird die Zuordnung der Phosphatgruppen-tragenden Aminosäure möglich (Gibson und Cohen, 1990). Der stabile aromatische Ring von Tyrosin verhindert den Verlust des Phosphatrestes. Phosphoryliertes Tyrosin ist mit einer Masse von 243Da und über ein spezifisches Immoniumion mit einer Masse von 216Da nachweisbar. Im MALDI-MS wird von phosphoryliertem Serin und Threonin das Phosphat in Form von Metaphosphorsäure HPO_3 oder Phosphorsäure H_3PO_4 abgespalten (Neutralverlust). Die Änderung der Peptid-Muttermasse $[\text{M}+\text{H}]^+$ zu $[\text{M}-\text{H}_3\text{PO}_4+\text{H}]^+$ und $[\text{M}-\text{HPO}_3+\text{H}]^+$ ist für phosphorylierte Peptide spezifisch. Im ESI-MS bleibt das phosphorylierte Peptid stabil erhalten. Erst im Tandem-MS-Modus wird das Peptid in signifikante Fragmentationen gespalten. Durch Neutralverlust von Phosphorsäure H_3PO_4 entstehen dabei die Produkte Dehydroalanin und Dehydroaminobuttersäure mit einer spezifischen Masse von 69Da und 83Da (Abb. I.13).

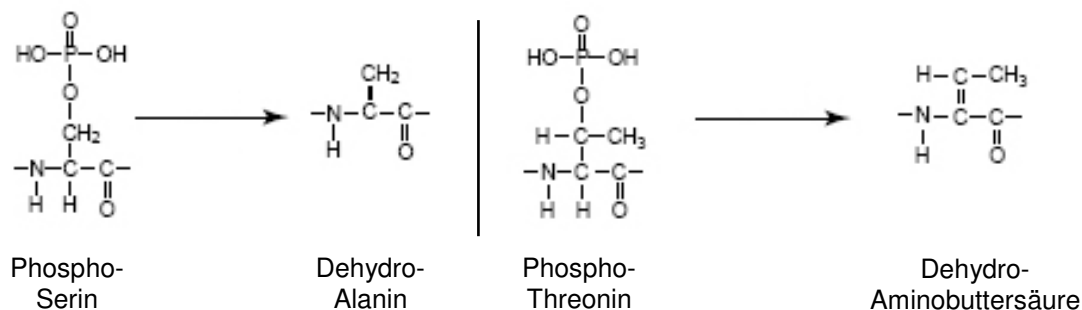


Abb. I.13: Serin- und Threonin-haltige Phosphopeptidionen verlieren im MS/MS-Modus neutrale Phosphorsäure (H_3PO_4). Dabei entstehen Dehydroalanin und Dehydroaminobuttersäure, die im positiven Ionisationsmodus detektiert werden.

B. Quantifizierungs-Strategien

Die Absolute und relative Quantifizierung der Expressionshöhe eines Proteins oder der Stärke einer Modifikation ermöglicht eine Charakterisierung von Signalkaskaden. Die Proteom-Forschung hat verschiedene Methoden entwickelt, die zur Quantifizierung von Proteinexpression und von posttranslationaler Modifikation in vergleichenden Analysen von krankem und gesundem Gewebe oder Kontroll- und perturbiertem Ansatz im Zellkultursystem eingesetzt werden. Die Quantifizierung von Phosphorylierungen steht im Fokus dieser Arbeit.

Die unter 4.A. beschriebenen Methoden zur Visualisierung von phosphorylierten Proteinen nach Trennung in der 2D-Elektrophorese eignen sich gleichzeitig auch zur Quantifizierung. 2DE-getrennte phosphorylierte Proteine können mit Phosphat-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen (Martin et al., 2003), durch Einbau von $^{32}\text{P}/^{33}\text{P}$ (Merrick et al., 1995) oder nach Westernblot mit spezifischen Antikörpern (Bendt et al., 2003) detektiert werden. Nach Anregung über geeignete Systeme und Digitalisierung der erhaltenen Signale ermöglichen Bildbearbeitungsprogramme wie AIDA (Raytest) eine densitometrische Erfassung der Signalstärken und somit einen relativen Vergleich zwischen unterschiedlich behandelten Proben. Die Limitierung der 2DE setzt allerdings Grenzen: hydrophobe Membranproteine sowie stark saure und basische Proteine werden in der 2DE nicht erfasst. Der dynamische Bereich der Nachweismethoden, die begrenzte Probenmenge und das unterschiedliche Färbeverhalten von Proteinen verhindern die Visualisierung von schwach exprimierten Proteinen. Proteine mit sehr ähnlichem isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht können nicht ausreichend aufgelöst werden und die Signalzuordnung ist oftmals nicht eindeutig. Insbesondere ist der Bezug zu einer für die differentielle Phosphorylierung verantwortlichen Phosphorylierungs-Stelle im Protein nicht möglich (Goshe, 2006).

Gel-freie Quantifizierungs-Methoden, die die Möglichkeit zur multidimensionalen Trennung über chromatographische Systeme und der on-line-Kopplung an ein Massenspektrometer geben, umgehen die Limitierungen der 2DE elegant. Methoden, die unter den Namen SILACTM, Cleavable ICAT[®] oder iTRAQTM (Applied Biosystems) geführt werden und kommerziell verfügbar sind, ermöglichen die relative Quantifizierung von Peptiden durch Markierung verschiedener Proben mit unterschiedlich schweren Isotopen. Zwei Arten der Markierung werden eingesetzt: die biologische Inkorporierung von Aminosäuren mit unterschiedlichem Isotopenanteil und die chemische Modifikation von Proteinen oder Peptiden nach Extraktion und Verdau.

SILACTM (Stable Isotope Labeling by Amino Aacids in Cell Culture) nutzt die biologische Inkorporierung Isotopen-markierter Aminosäuren (Ong et al., 2002). Der Vergleich zweier Zellzustände wird möglich, indem ein Zellansatz mit normalem, der zweite mit modifiziertem Kulturmedium angezogen wird, indem eine essentielle Aminosäure wie Lysin, Arginin oder Leucin vollständig gegen eine Isotopen-markierte Form ersetzt ist. Nach Durchführung des Experiments werden die Zellen beider Ansätze lysiert, die Proteine extrahiert und vereint. Die durch tryptischen Verdau erhaltenen Peptide werden massenspektrometrisch analysiert. Im Massenspektrum treten identische Peptide aus beiden Ansätzen immer im Paar auf, wobei sich das Massen-Delta der Peptidionen beider Ansätze über den Ladungszustand und Anzahl und Art der modifizierten Aminosäuren im Peptid definiert. Die Quantifizierung erfolgt durch Vergleich der Peakintensitäten der Peptid-Muttermassen.

Auf der chemischen Markierung Cystein-haltiger Proteine mit unterschiedlich schweren dreiteilig aufgebauten Reagenzien beruht das ICAT[®]-Verfahren (Isotope-coded Affinity Tag; Gygi et al., 1999). Die mit 442Da sehr großen Reagenzien bestehen aus einer Biotin-Gruppe, einer Thiol-spezifischen reaktiven Gruppe und einem Linker, welcher beide Gruppen verbindet. Über den Einbau von deuteriertem Wasserstoff in den Linker können zwei chemisch identische, aber unterschiedlich schwere ICAT[®]-Reagenzien hergestellt werden, die sich in einem Massen-Delta von 8 Da unterscheiden. Proteine aus zwei zu vergleichenden Proben werden reduziert und die so zugänglichen Cystein-Sulfhydrylgruppen mit einem der beiden ICAT[®]-Reagenzien markiert. Nach Probenmischung und enzymatischem Verdau wird der Biotin-Anteil genutzt, um markierte Peptide anzureichern. Ähnlich zu SILAC werden Peptid-Paare aus beiden Proben im Massenspektrum erfasst und über die Peakintensität relativ quantifiziert.

Die Vorteile der SILACTM-Methode liegen in den niedrigen Kosten der Isotopen-markierten Aminosäuren und der noch vor Durchführung des Experimentes erfolgten biologischen Inkorporierung, wodurch der experimentelle Fehler minimiert wird. Für Proben klinischen Ursprungs kann SILACTM jedoch nicht eingesetzt werden. Die Quantifizierung von Phosphorylierungs-Stellen durch SILACTM ist publiziert (Bose et al., 2006; Gruhler et al., 2005; Amanchy et al., 2005), hängt aber davon ab, ob das modifizierte Peptid die markierte Aminosäure trägt. Das ICAT[®]-Verfahren ist nicht geeignet, um posttranslationale Modifikationen zu quantifizieren, da nur Cystein-haltige Peptide angereichert werden und die Schnittmenge von Cystein-haltigen Peptiden, die gleichzeitig potentielle Phosphorylierungs-Stellen tragen, relativ gering ist.

Das für die quantitative Analyse von potentiellen Phosphorylierungs-Stellen (Jones et al., 2006; Zhang et al., 2005) und von Protein-Expression (Liu et al., 2007; Sui et al., 2007) bereits erfolgreich eingesetzte iTRAQ™-Verfahren (Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation; Ross et al., 2004) dagegen erfasst sämtliche Peptide einer Probe und kann sowohl auf Zellkultur-Ansätze wie auch auf Proben biologischen Ursprungs angewendet werden. Das System besteht aus vier verschiedenen schweren Reagenzien, die dreiteilig aufgebaut sind (Abb. I.14A).

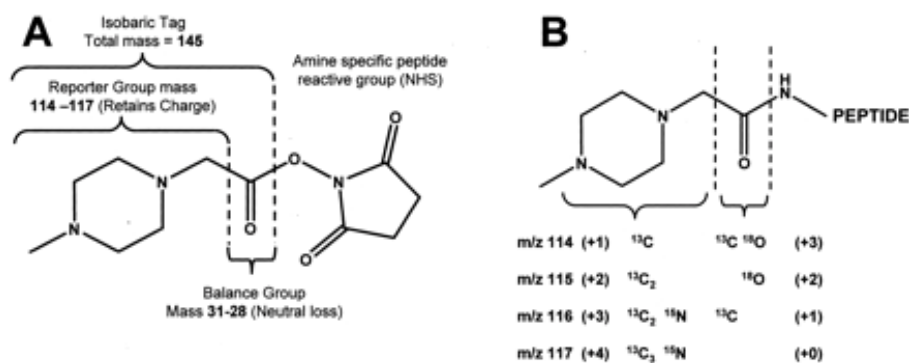


Abb. I.14: Die vier Isotopen-markierten iTRAQ™-Reagenzien. (A) schematischer Aufbau, (B) Isotopen-Verteilung der vier verschiedenen Reagenzien (Ross, 2004).

Über eine Amin-spezifische reaktive Gruppe werden die Reagenzien an den N-Terminus und Lysin-Seitenketten gekoppelt. Ein Balancer-Anteil verbindet die reaktive Gruppe mit der Reporter-Gruppe. Durch unterschiedlichen Isotopeneinbau während der Synthese unterscheidet sich die Masse der Reporter-Gruppe in jedem der vier Reagenzien von 114 bis 117Da. Durch ebenfalls unterschiedlich schwere Balancer-Anteile addiert sich die Gesamtmasse eines jeden Reagenz auf 145Da auf (Abb. I.14B).

Bis zu vier verschiedene Ansätze können parallel verglichen werden. Nach Protein-Extraktion und Verdau wird jeder Ansatz mit einem der Reagenzien modifiziert. Die so modifizierten Proben werden gemischt und der HPLC-MS/MS-Analyse zugeführt. Da sich die vier Reagenzien chemisch nicht voneinander unterscheiden, beeinflussen sie die Retentionszeit identischer Peptide aus unterschiedlichen Proben in identischer Weise. Die Quantifizierung erfolgt bei iTRAQ™ im Fragmentationenspektrum. Im MS/MS-Modus werden die iTRAQ™-Reagenzien in Reporter und Balancer gespalten. Neben der Peptidsequenzierung erhält man ein zum jeweils

eingesetzten Reporter zugehöriges Signal von 114 bis 117Da (Abb. I.15). Durch Vergleich der Signalintensitäten können die relativen Anteile dieses Peptides in den vier Proben bestimmt werden.

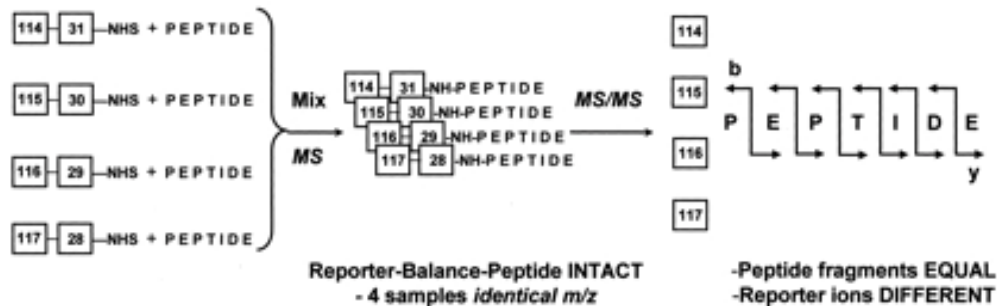


Abb. I.15: iTRAQ™ ermöglicht den Vergleich von vier verschiedenen Ansätzen. Nach chemischer Modifikation der Peptide aus vier Proben mit je einem Isotopen-markiertem Reagenz werden diese gemischt und die Peptide im MS/MS-Modus fragmentiert. Das Massenspektrum enthält Informationen über die Peptid-Sequenz und die relative Intensität des jeweiligen Peptides in den verschiedenen Proben (Ross et al., 2004).

C. Kinase-selektive Affinitäts-Chromatographie

Kinasen stellen mit über 500 Mitgliedern eine der größten Proteinfamilien im humanen Genom dar. Trotzdem ist deren systematische Analyse eine methodische Herausforderung für die Proteomforschung. Bei einem theoretischem Verdau des humanen Proteoms mit der Endoprotease Trypsin, die aufgrund ihrer Effektivität, Selektivität und der statistischen Schnittstellen-Verteilung sehr häufig in der massenspektrometrischen Probenvorbereitung zum Einsatz kommt, stammen von über 800.000 möglichen Peptiden mit einem massenspektrometrisch relevantem Molekulargewicht von 800 bis 4800 Da nur ca. 1.8% von Kinasen ab (Abb. I.16). Zusätzlich zählen viele Kinasen zu den gering exprimierten Proteinen und selbst multidimensionale chromatographische Verfahren besitzen nicht die nötige Trennkapazität, die für eine Kinase-Identifizierung im komplexen Peptid-Gemisch erforderlich ist. Eine Identifizierung posttranslationaler Modifikationen an Proteinen dieser Enzymklasse in einer komplexen Probe ist nahezu unmöglich. Die biochemische Charakterisierung von Kinasen erfordert deshalb eine effiziente Anreicherung. Die oft eingesetzte Reinigung über spezifische Antikörper ermöglicht allerdings nur die Analyse einzelner Kinasen (Boeri et al., 2005; Anjum et al., 2005) und ist für einen systematischen Ansatz nicht ausreichend.

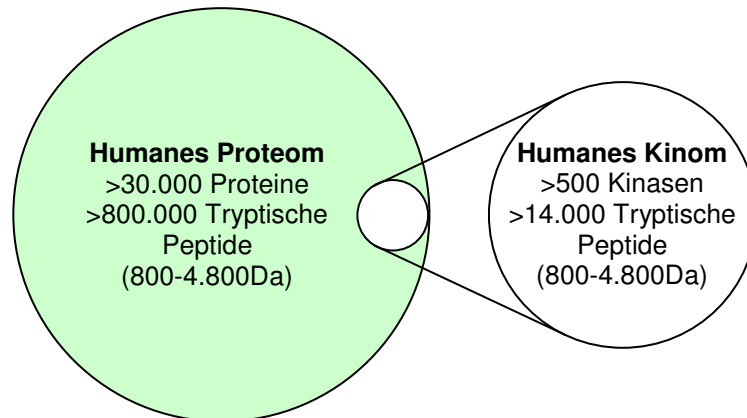


Abb. I.16: Der theoretische Verdau der über 500 humanen Protein-kinasen mit der Endoprotease Trypsin generiert nur ca. 1.8% aller möglichen tryptischen Peptide im humanen Proteom.

Eine Anreicherung von Kinasen über niedermolekulare Moleküle wurde erstmals 1985 eingesetzt (Inagaki et al., 1985). Durch Immobilisierung des Isoquinolin-Sulfonamid-Derivates H-9 konnten die Proteinkinase C (PKC), cAMP- (PKA) und cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG) aus Hirnextrakten gereinigt werden. In nachfolgenden Ko-Kristallisationsansätzen wurde demonstriert, dass die primäre Aminogruppe von Isoquinolin-Sulfonamid-Derivaten eine Immobilisierung in einer Orientierung ermöglicht, die sterisch nicht mit der Bindung zu den Kinasen interferierte (Engh et al., 1996; Abb. I.17).

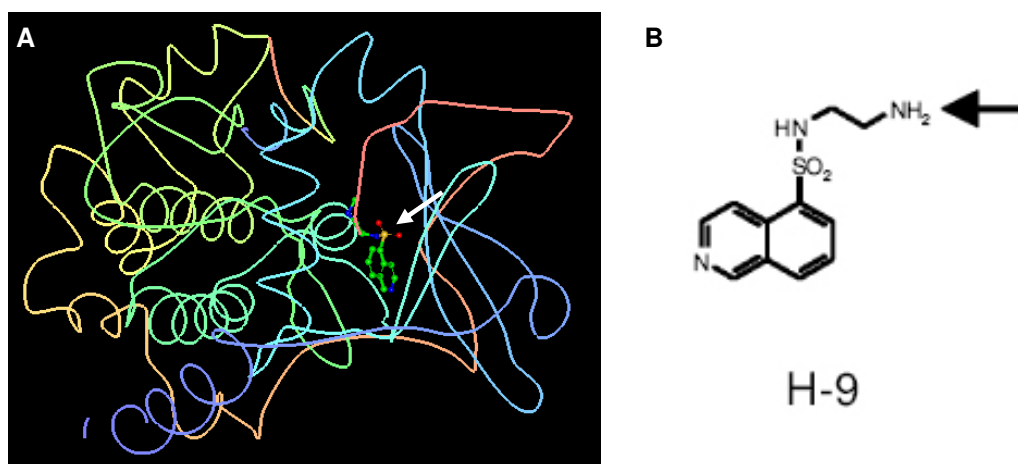


Abb. I.17: Modell der Interaktion der katalytischen PKA-Untereinheit mit dem niedermolekularen Inhibitor H-8 basierend auf Röntgen-Strukturanalysen (Engh et al., 1996). (A) Die 2-(Methylamino)-ethyl-Einheit (Pfeil) von H-8 ragt aus dem aktiven Zentrum von PKA heraus. (B) Die zur Immobilisierung von H-9 verwendete analoge Aminogruppe (Pfeil) von H-8 (Daub et al., 2004).

Die zur Affinitätsreinigung eingesetzten Substanzen sind ATP-kompetitive Kinase-Inhibitoren, die aus der Entwicklung pharmakologisch aktiver Reagenzien zur Behandlung von Entzündungsprozessen oder Krebserkrankungen stammen (Cohen, 2002). Klinisch relevante Kinase-Inhibitoren aus der Gruppe der ATP-Mimetika müssen selektiv und hochaffin sein, da die ATP-Bindetasche von Kinasen bis zu einem gewissen Grade konserviert ist und die intrazelluläre ATP-Konzentration im millimolaren Bereich liegt (Mikalsen et al., 2006). Niedermolekulare Komponenten werden auf der Basis der dreidimensionalen Struktur der ATP-Bindungstasche der Zielkinase (Struktur-basierter Bibliothek-Screen) oder aufgrund ihrer Struktur-Ähnlichkeit zu ATP selbst (Ligand-basierter Bibliothek-Screen) synthetisiert (Force et al., 2004). Da nur für ca. 10% aller humanen Kinasen Strukturdaten vorhanden sind, ist die Synthese eines selektiven ATP-kompetitiven Inhibitors zum Teil noch sehr empirisch und die Überprüfung der inhibitorischen Wirkung in Kinase-Assays gibt keinen Rückschluss auf das vollständige Substratspektrum eines Inhibitors. Die Sensitivität der massenspektrometrischen Protein-Identifizierung in Kombination mit der Immobilisierung von Kinase-Inhibitoren ermöglicht die Anreicherung von Kinasen aus Zelllysaten und dadurch die umfassende Charakterisierung von Zielkinasen für einen Inhibitor. Durch diesen Ansatz wurden z.B. das Kinase-Spektrum des von der FDA zur Behandlung von EGFR-basierten (Epidermal Growth Factor Receptor) Krebserkrankungen zugelassenen ATP-kompetitiven Inhibitor ZD1839 (IressaTM, gefitinib; AstraZeneca; Muhsin et al., 2003) identifiziert. Neben EGFR zeigen über 20

zusätzliche Kinasen eine Affinität zu ZD1839, wodurch eine Erklärung von Nebenwirkungen dieses „Third-Line“-Therapeutikums möglich wird (Brehmer et al., 2005).

Affinitäts-chromatographische Strategien mit für Kinasen selektiven chemischen Sonden erlauben mittlerweile eine umfassende Anreicherung von Kinasen des humanen Kinoms (Wissing et al., 2007) und deren Einsatz in der akademischen Forschung

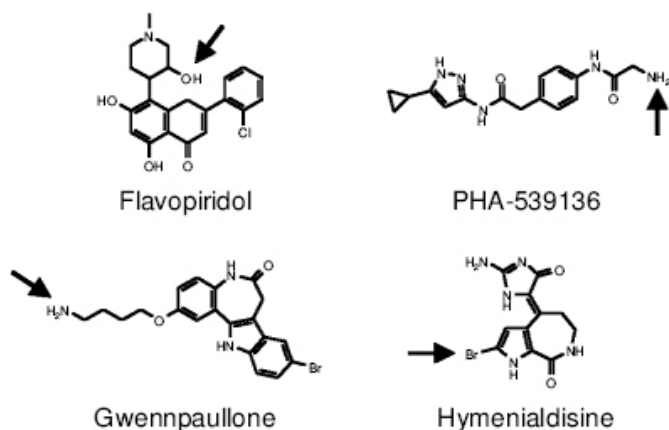


Abb. I.18: Proteinkinase-Inhibitoren, die zur Affinitätsreinigung zellulärer Kinasen eingesetzt wurden. Der jeweilige Pfeil markiert die zur Immobilisierung genutzte funktionelle Gruppe (Daub et al., 2004).

ermöglicht neue Ansätze zur biochemischen Untersuchung dieser Enzymklasse. Verschiedene immobilisierte Inhibitoren, die bislang zur unspezifischen aber selektiven Kinase-Reinigung eingesetzt wurden, sind in Abb. I.18 gezeigt (Daub et al., 2004).

II Zielsetzung der vorliegenden Dissertation

Die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met reguliert eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Die Aktivierung durch den physiologischen Liganden HGF/SF steuert mitogene, motogene und morphogene Prozesse (Birchmeier et al., 2003). Im Gegensatz hierzu moduliert das human-pathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* die c-Met-Signalkaskade, um seine Aufnahme in ein breites Wirtszell-Spektrum zu induzieren (Shen et al., 2000). Der *listerielle* Virulenzfaktor InlB bindet und aktiviert c-Met, wodurch die nachfolgende Signaltransduktion in einer komplexen Reorganisation des Aktinzytoskeletts und einer Reißverschluss-artigen Invasion des Pathogens resultiert (Hamon et al., 2006). In der Signalübertragung übernehmen Kinasen durch Phosphorylierung spezifischer Substrat-Proteine eine fundamentale Rolle (Manning et al., 2002). Bislang sind nur wenige Kinasen als für die *listerielle* Invasion kritische Komponenten beschrieben (Copp et al., 2003; Bierne et al., 2001; Shen et al., 2000) und es ist anzunehmen, dass unter den über 500 im humanen Genom kodierten Mitgliedern dieser Familie (Manning et al., 2000) weitere Kinasen für die InlB-vermittelte Aufnahme des Pathogens in die Wirtszelle relevant sind.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht deshalb die Identifizierung von Kinasen, welche eine potentielle Rolle in der *listeriellen* Wirt-Pathogen-Interaktion durch den Virulenzfaktor InlB einnehmen.

Da Kinasen zu den niedrig-exprimierten Signalproteinen einer Zelle zählen und für eine biochemische Analyse nur schwer zugänglich sind, fokussiert diese Studie auf der Entwicklung einer zur systematischen Reinigung und Charakterisierung von Kinasen geeigneten Strategie. Für die Anreicherung von Kinasen soll ein gezielt zur unselektiven Bindung entwickelter ATP-kompetitiver Kinase-Inhibitor als Affinitätsmatrix eingesetzt werden. Im ersten Teil dieser Arbeit soll das Kinase-Spektrum des Inhibitor-Moleküls durch massenspektrometrische Protein-Identifizierung charakterisiert werden.

Die katalytische Aktivität, Lokalisation und Stabilität von Kinasen wird hauptsächlich durch posttranslationale Phosphorylierung reguliert. Kinasen, welche sich als Effektoren des *listeriellen* Virulenzfaktors InlB auszeichnen, sollten deshalb durch ein differentielles Phosphorylierungs-Muster identifizierbar sein. Neben einer erfolgreichen systematischen Reinigung dieser Enzym-Familie besteht deshalb eine weitere Herausforderung dieser Arbeit in der umfassenden Charakterisierung von Phosphorylierungen an Kinasen. Durch Peptidsequenzierung soll die exakte Zuordnung von Phosphorylierungs-Stellen an Kinasen erreicht werden. Spezifisch

durch InlB induzierte differentielle Phosphorylierungen können allerdings erst durch die Erhebung quantitativer Daten identifiziert werden. Neben der Charakterisierung ist deshalb die relative Quantifizierung posttranslationaler Phosphorylierungen an Kinasen eine weitere Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit. Sofern möglich sollen früheste Veränderungen am Phosphorylierungs-Muster von Kinasen nach Bindung von InlB an die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met identifiziert werden. Abschließend soll durch einen qualitativen Vergleich zur HGF/SF-stimulierten c-Met-Signalkaskade weiterhin untersucht werden, ob der *listerielle* Virulenzfaktor InlB den physiologischen c-Met-Liganden HGF/SF nachahmt oder auf molekularer Ebene spezifische Ereignisse induziert, die zur effizienten Invasion des Pathogens beitragen.

III Ergebnisse

1. Eine Kinase-selektive Affinitäts-Reinigung für die quantitative Analyse differentieller Phosphorylierungen

Die niedrige Stöchiometrie von Kinasen im Vergleich zu ihren Substratproteinen erschwert die Kinom-weite Analyse dieser Proteinfamilie erheblich. Die systematische Charakterisierung von Phosphorylierungen an Kinasen in einem Gesamt-Zellextrakt ist nahezu unmöglich. Selbst die bislang umfassendsten Phosphoproteom-Studien konnten nur wenige phosphorylierte Peptide in Kinasen charakterisieren (Beausoleil et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher eine experimentelle Strategie erstellt werden, mit der differentielle Phosphorylierungen an der Enzymklasse der Kinasen nach Stimulation der c-Met Signalkaskade mit dem *listeriellen* Virulenzfaktor InlB bzw. mit dem physiologischen Liganden HGF/SF quantitativ erfasst werden können. Der hierfür gewählte Ansatz ist in Abb. III.1 zusammengefasst und bestand aus folgenden Arbeitsschritten:

- (i) Aktivierung der c-Met Signalkaskade
- (ii) Kinase-selektive-Affinitäts-Chromatographie
- (iii) Chemische Modifikation von Peptiden zur Quantifizierung (iTRAQ™)
- (iv) Reinigung phosphorylierter Peptide (Ga^{3+} -IMAC)
- (v) Multidimensionale Peptidtrennung und Peptidfragmentierung
- (vi) Datenauswertung:
 - a. Proteinidentifizierung
 - b. Zuordnung der Phosphorylierungs-Stelle
 - c. Relative Quantifizierung der Phosphorylierung

Die Basis der systematischen Analyse von Phosphorylierungen an Kinasen war eine effektive Affinitäts-chromatographische Vorfraktionierung (Abb. III.1ii) mit einem selektiven Liganden der ATP-Bindungsregion. Geeignete Substanzen hierfür sind ATP-kompetitive nieder-molekulare Kinase-Inhibitoren (Daub, 2004). Ein zur Anreicherung eingesetzter Inhibitor sollte für Proteine aus der Kinase-Familie möglichst selektiv sein. Gleichzeitig sollte durch die Wahl der Struktur eine Interaktion zu einer umfassenden Anzahl an Kinasen ermöglicht werden. Zusätzlich sollte sich eine Immobilisierung des Inhibitors an eine Affinitäts-Matrix nicht negativ auf die Interaktion zu Kinasen auswirken.

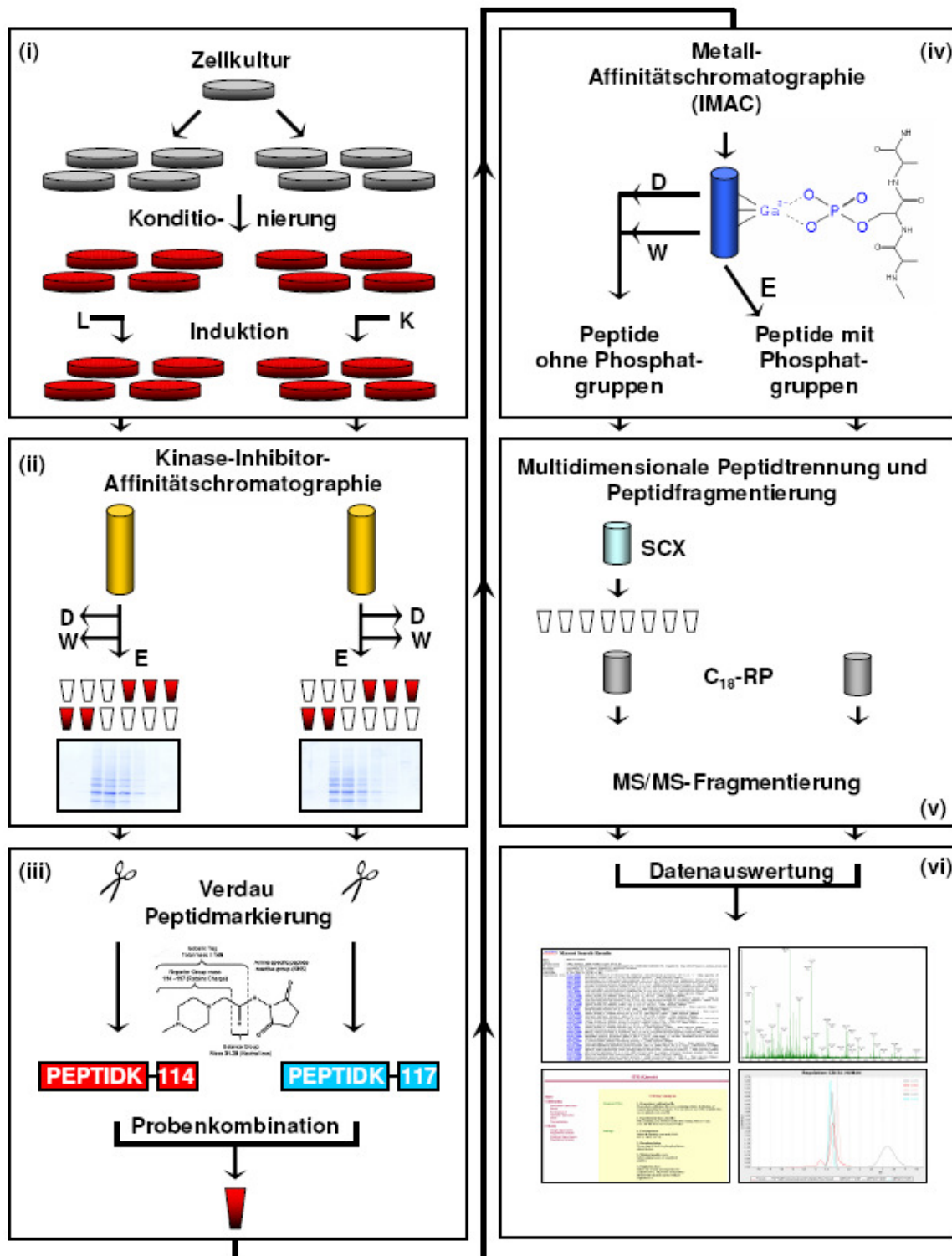


Abb. III.1: Experimentelle Strategie zur quantitativen Analyse differentieller Phosphorylierungen an Kinasen nach Aktivierung von c-Met (L: Ligand/stimulierter Ansatz, K: Kontrollansatz, D: Durchlauf, W: Waschfraktion, E: Eluat, SCX: Kationenaustausch-Chromatographie, RP: Umkehrphasen-Chromatographie).

Der in dieser Arbeit eingesetzte immobilisierte Inhibitor wurde auf Basis eines neuartigen Pyrido[2,3-d]-Pyrimidin-Ringsystems entwickelt und gezielt zur selektiven Bindung eines breiten Spektrums von Kinasen modifiziert. Das Grundgerüst stammte

aus einer Molekül-Bibliothek, die zur hochaffinen Inhibierung der Rezeptor-Tyrosinkinasen PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor), FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor), EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) und der cytosolischen Tyrosinkinase c-Src synthetisiert wurde (Klutchko et al., 1998). Durch Derivatisierung der Grundstruktur auf Basis von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) wurden die IC₅₀-Werte für die genannten Kinasen schrittweise von einem mikromolaren auf einen niedrigen nanomolaren Bereich verbessert (Tab. III.1).

Tab. III.1: IC₅₀-Werte von PP2, PP38, PP58 und PP63 für die Inhibierung der Tyrosinkinasen PGDFR, FGFR, c-SRC und EGFR (Klutchko et al., 1998).

PP-Nr.	R1	R2	IC ₅₀ (μM)			
			PDGFR	FGFR	c-Src	EGFR
2	NH ₂	Me	4.9	1.3	0.26	5.6
38	NHPh	Me	0.40	0.46	0.02	0.26
58	NHPh-4-O(CH₂)₂NH₂	Me	0.074	0.055	0.013	n.b.
63	NHPh-4-O(CH ₂) ₂ NEt ₂	Me	0.079	0.043	0.009	0.044

n.b.: nicht bestimmt

Daraus resultierte u. a. die Substanz PP58 (Abb. III.2A), die dem in dieser Arbeit verwendeten Inhibitor zugrunde liegt. In *in-vitro* Kinase-Assays zeigte PP58 IC₅₀-Werte von 0.074μm (PDGFR), 0.055μm (FGFR) und 0.013μm (c-Src). Am aus demselben Synthese-Ansatz stammenden Derivat PP63 (PD166285, Abb. III.2B) wurde in kinetischen Studien nach Michalis-Menten gezeigt, dass die inhibitorische Wirkung der Pyrido[2,3-d]-Pyrimidin-Derivate ATP-kompetitiv ist (Panek et al., 1997).

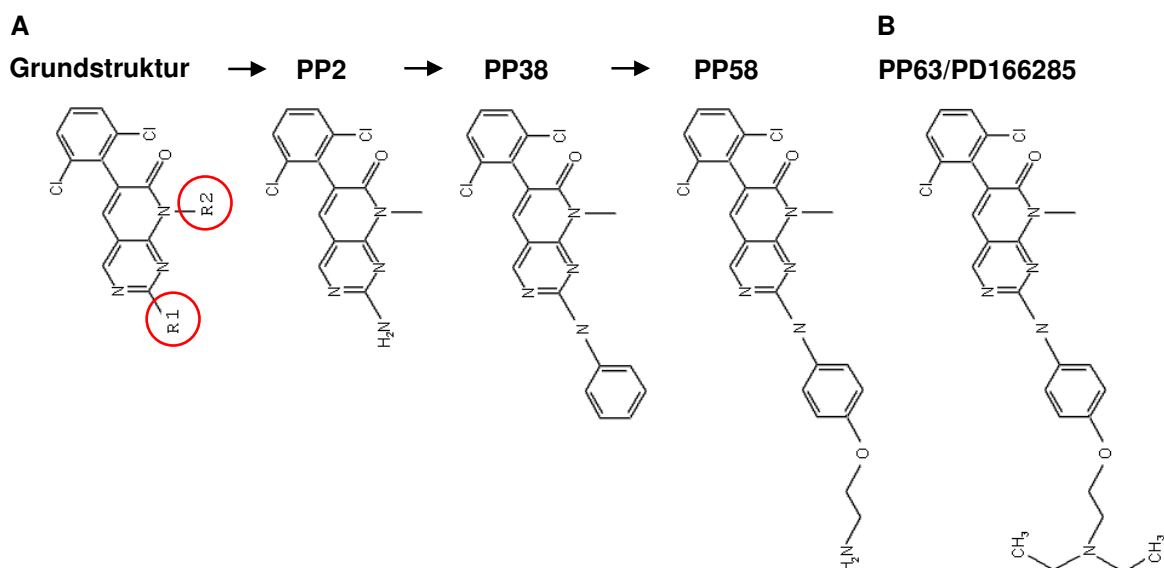


Abb. III.2: SAR-basierte Entwicklung des Kinase-Inhibitors PP58. (A) das modifizierte pyrido[2,3-d]pyrimidin-Ringsystem diente als Grundgerüst; durch Einführung einer NH₂- (R1) und einer Methylgruppe (R2) entstand die Struktur 2-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-1 (**PP2**); die weitergehende Modifikation der Seitenkette R1 führt zu den Strukturen **PP38** und **PP58** (Klutchko et al., 1998). (B) Der Inhibitor PP63/PD166285 wurde in kinetischen Experimenten zur Bestimmung der ATP-kompetitiven Eigenschaften eingesetzt (Panek et al., 1997).

Für die weitere Syntheseplanung des in dieser Arbeit eingesetzten Moleküls wurden genetische Studien zur Resistenzentwicklung der konstitutiv aktiven Kinase BCR-Abl gegen den in der CML-Therapie (Chronische Myeloische Leukämie) eingesetzten Kinase-Inhibitor STI571 (GleevecTM, Novartis) zu Grunde gelegt. Aufgrund einer Mutation des polaren Threonins T³¹⁵ zum räumlich größeren unpolaren Isoleucin, die vermehrt bei Patienten mit fortgeschrittener CML beobachtet wurde, kann der Inhibitor nicht mehr in eine hydrophobe Tasche in der ATP-Bindungs-Domäne inserieren. PDGFR, c-Src und FGFR besitzen in ihrer ATP-Bindungstasche ein dem BCR-Abl-Threonin T³¹⁵ homologes Threonin. Die Mutation des homologen Threonins T³⁴¹ von c-Src zu Methionin lässt eine Blockierung der ATP-Bindungstasche durch PP58 nicht mehr zu und in COS-7 Zellen ist die Inhibierung von c-Src T341M durch PP58 erfolglos. Modellierungen konnten zeigen, dass PP58 zwei H-Brücken zu Methionin M³⁴⁴ ausbildet und der Dichlorphenyl-Ring in der hydrophoben Tasche der ATP-Bindungs-Domäne liegt. (Abb. III.3A). In der mutierten Form c-Src T341M verhindert das Methionin sterisch die Einlagerung der Dichlorphenyl-Gruppe in die hydrophobe Einbuchtung, weshalb PP58 nicht mehr inhibitorisch wirken kann (Abb. III.3B; Blencke et al., 2004).

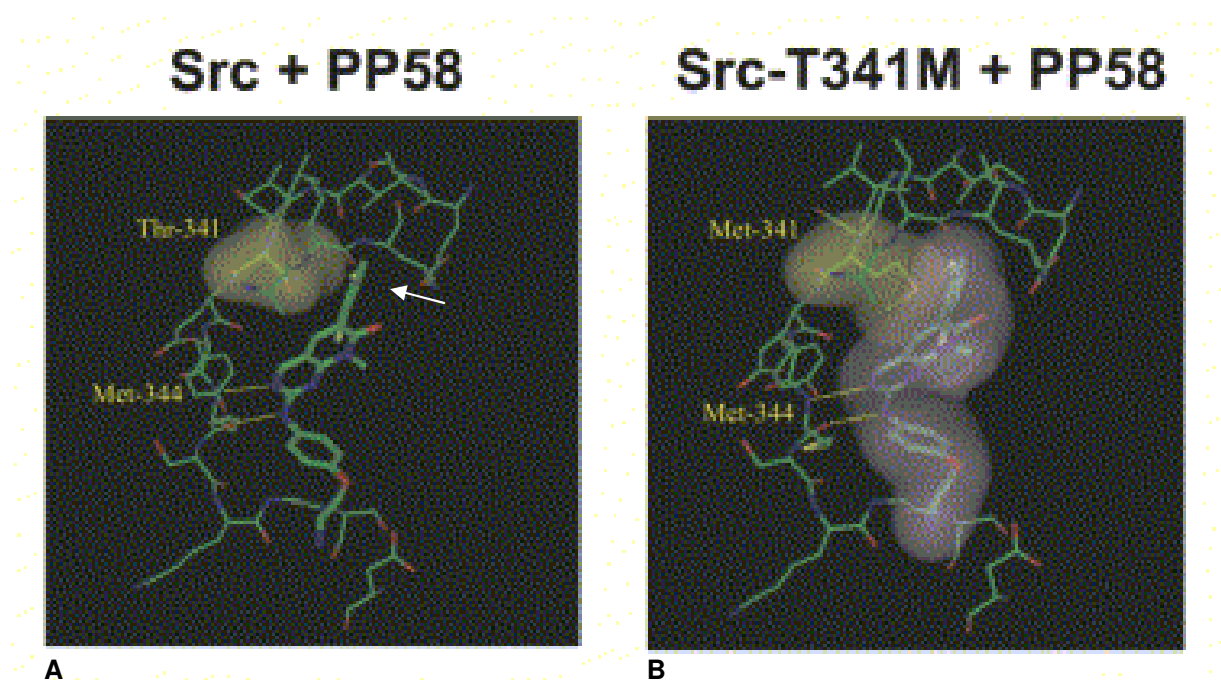


Abb. III.3: Der Einfluss des Threonin T³⁴¹ von c-Src auf die PP58-Bindung. (A) Die Dichlorphenyl-Gruppe (Pfeil) von PP58 ist in die hydrophoben Tasche der ATP-Bindungs-Domäne von c-Src eingebunden; (B) das größere Methionin in der Mutation T341M verhindert die Zugänglichkeit der hydrophoben Tasche für die Dichlorphenyl-Gruppe von PP58 (Blencke et al., 2004).

Aufgrund der Lage der von T³¹⁵ der Abl-Kinase bzw. von T³⁴¹ von c-Src am Eingang der hydrophoben Tasche in der ATP-Bindungs-Domäne wird diese Aminosäure als

Gatekeeper bezeichnet (GK; Noble et al., 2004). Da ca. 70% aller humanen Kinasen eine räumlich große GK-Aminosäure wie Methionin, Leucin oder Phenylalanin besitzen (Manning et al., 2002), sollten nur max. 30% des humanen Kinoms eine Affinität zu PP58 aufbauen können. Auf Basis dieser Daten wurde der in dieser Arbeit verwendete Inhibitor in zwei Punkten im Vergleich zu PP58 verändert (Abb. III.4): durch Entfernung der Dichlorphenyl-Gruppe von PP58 sollte ein Inhibitor generiert werden, der ein breiteres Substratspektrum zeigt als PP58. Ein der resultierenden Struktur 2 ähnlicher Inhibitor zeigte allerdings eine stark verminderte Affinität zur Kinase Cdk4, die durch Substitution der Methylgruppe am N₈-Stickstoffatom durch einen Cyclopentylring kompensiert werden konnte (Barvian et al., 2000). Um einen eventuellen Affinitätsverlust des in dieser Arbeit eingesetzten Moleküls entgegen zuwirken, wurde ebenfalls ein Cyclopentyl-Ring an analoger Stelle eingebracht. Der abschließend synthetisierte ATP-kompetitive niedermolekulare Kinase-Inhibitor 2-[4-(2-Amino-ethoxy)-phenylamino]-8-cyclopentyl-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-on ist in Abb. III.4 gezeigt und erhält die Bezeichnung V16743.

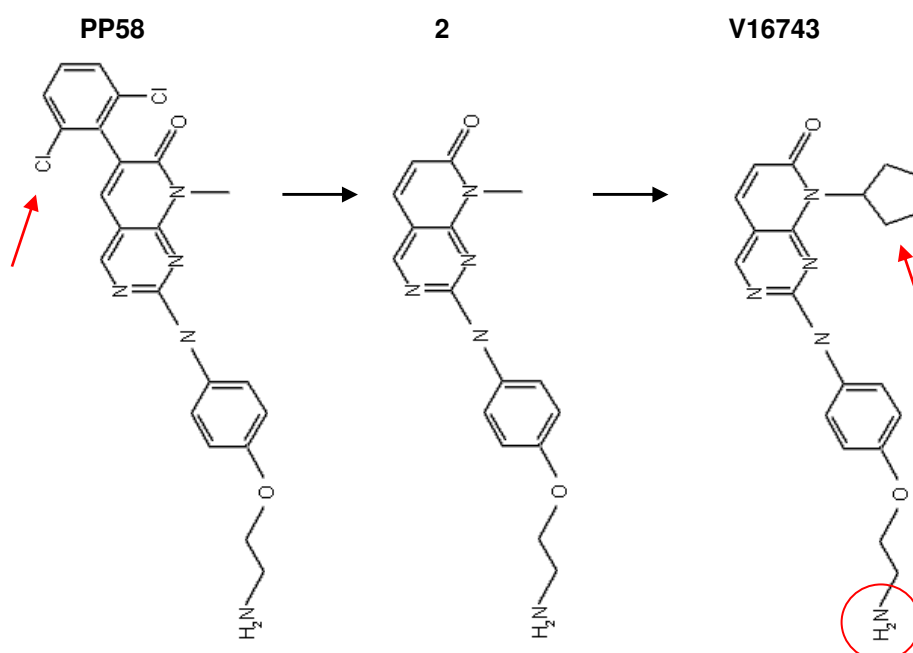


Abb. III.4: Strukturunterschiede von PP58 und V16743. Von der Grundstruktur PP58 ausgehend sollte das Substratspektrum von PP58 durch Entfernen der Dichlorphenyl-Gruppe erhöht werden. Ein eventuell auftretender Affinitätsverlust zur ATP-Bindungs-Domäne sollte durch Substitution der Methylgruppe durch einen größeren Cyclopentylring kompensiert werden. Die daraus entstandene Struktur V16743 wurde in dieser Arbeit zur quantitativen Reinigung von Kinasen eingesetzt. Die Amino-Gruppe von V16743 wurde zur Immobilisierung genutzt.

Die Herstellung einer funktionellen V16743-Affinitätsmatrix erfolgte auf Basis von Strukturanalysen der Abl Kinase Domäne in Komplex mit dem zu PP58 ähnlichen Inhibitor PD173955. Aus dem Ribbon-Diagramm in Abb. III.5A geht hervor, dass die 2-Anilino-Gruppe von PD173955 die einzig frei zugängliche Gruppe des Inhibitors ist. Die Dichlorphenyl-Gruppe liegt in der hydrophoben Einbuchtung der ATP-Bindungstasche wie für die PP58-c-Src-Interaktion in Abb. III.3 dargestellt. In Abb. III.5B sind die an den Van der Waals-Kräften zwischen PD173955 und Abl beteiligten Aminosäuren markiert (Nagar et al., 2002). Das T³¹⁵ der Abl-Kinase entspricht dem in Abb. III.3 gezeigten T³⁴¹ von c-Src.

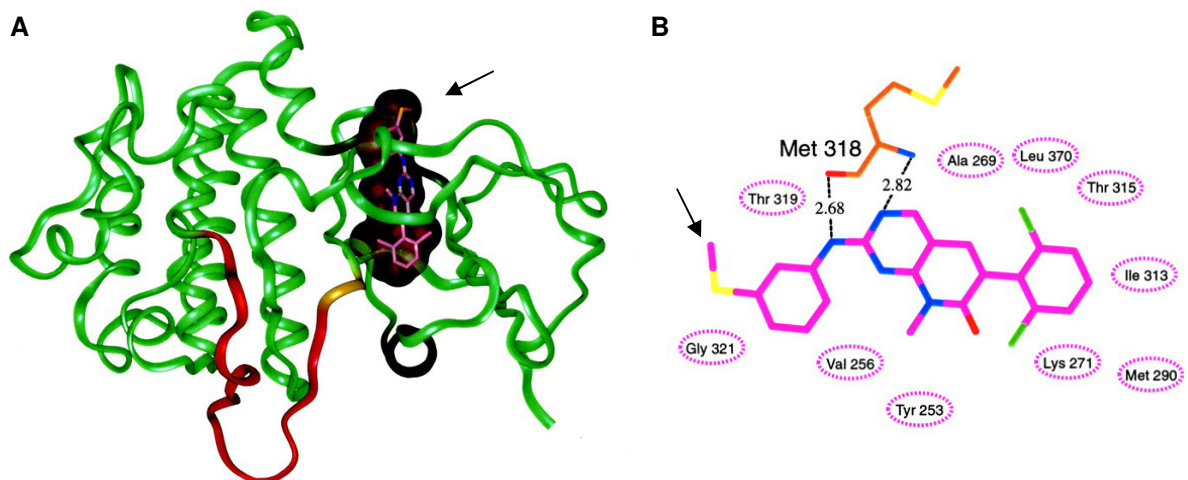


Abb. III.5: Die 2-Anilino-Gruppe von PD173955 ist nicht an der Interaktion zur ATP-Bindungstasche beteiligt. (A) Ribbon-Diagramm der Abl Kinase Domäne (grün) mit dem Pyrido[2,3-d]-Pyrimidin-Derivat PD173955. Die Aktivierungs-Schleife der Abl Kinase ist in rot dargestellt; PD173955 liegt in der ATP-Bindungstasche, der 2-Anilino-Substituent ist frei zugänglich (Pfeil); (B) Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen PD173955 und der Abl Kinase: H-Brücken sind in schwarz gepunkteten Linien angegeben, die an der Ausbildung von Van der Waals-Interaktionen beteiligten Aminosäuren von Abl sind durch gepunktete Kreise dargestellt; die 2-Anilino-Gruppe des Inhibitors ist in keine direkten Aminosäure-Interaktion eingebunden (Pfeil); Stickstoff-Atome sind blau, Sauerstoff-Atome rot, Chlor-Atome grün, Schwefel-Atome gelb, Protein-Kohlenstoff-Atome orange und Inhibitor-Kohlenstoff-Atome rosa markiert (Nagar et al., 2002).

Das zum M³⁴⁴ (Abb. III.3) von c-Src homologe M³¹⁸ der Abl Kinase ist in Abb. III.5B als Stab-Modell gezeigt. Auf diesen Strukturdaten aufbauend wurde PP58 über die freie NH₂-Gruppe mit einem PEG-Linker modifiziert und in *in-vitro* Kinase-Assays im Vergleich mit dem unmodifizierten PP58 auf das Inhibierungspotential von c-Src charakterisiert. Die PEGylierung hatte keinen Einfluss auf die c-Src-Inhibierung und über immobilisiertes PP58 konnte c-Src aus HeLa-Gesamtzell-Extrakten angereichert werden (Wissing et al., 2004). Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte die Immobilisierung des niedermolekularen Inhibitors V16743 durch Kopplung der freien Aminogruppe (Abb. III.4) an die Carboxylgruppe von ECH-

Sepharose 4B nach der Karbodiimid-Methode. ECH-Sepharose besitzt einen aus 10 Atomen bestehenden 6-Aminohexanon-Säure-Linker, der ausreichende Flexibilität und Zugänglichkeit des immobilisierten V16743 (Abb. III.6) gewährleistet (Wissing et al., 2004).

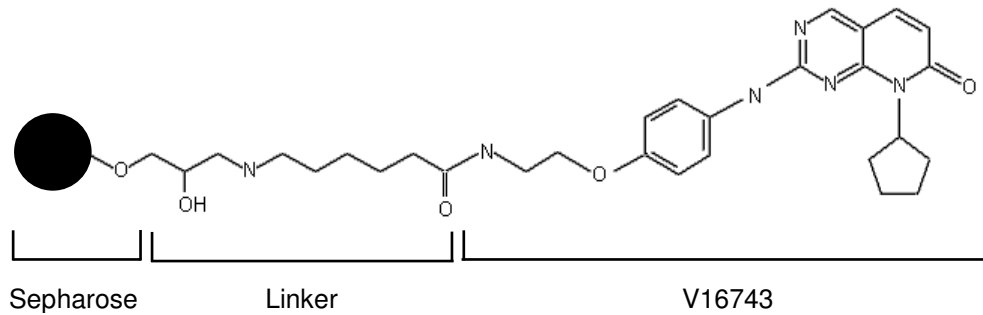


Abb. III.6: Die Struktur des immobilisierten ATP-kompetitiven Kinase-Inhibitors V16743. Durch EDC-katalysierte Kopplung wurde die freie Aminogruppe von V16743 mit der Carboxylgruppe der 6-Aminohexanon-Säure von ECH-Sepharose 4B verknüpft. Die 10 Atome des 6-Aminohexanon-Säure-Linkers gewährleiten ausreichende Flexibilität von V16743.

A. Das Substrat-Spektrum des ATP-kompetitiven Kinase-Inhibitors
 2-[4-(2-Amino-ethoxy)-phenylamino]-8-cyclopentyl-8*H*-pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-
 7-on (V16743)

Die Charakterisierung des Substrat-Spektrums des immobilisierten Kinase-Inhibitors V16743 wurde nach der in Abb. III.1 vorgestellten experimentellen Strategie in fünf unabhängigen Experimenten in der humanen Cervix-Karzinom-Zelllinie HeLa S3 durchgeführt. Das Ziel dieser Experimente war eine möglichst umfassende Anreicherung humaner Proteinkinasen. Die Fragmentierung sämtlicher aus einem V16743-Eluat hergestellten tryptischen Peptide erfolgte nach Elektrospray-Ionisation in einem Q-TOF-Micro™-Massenspektrometer durch CID mit für iTRAQ™-modifizierten Peptiden optimierten Kollisions-Energien. ESI-Q-TOF-MS-Daten und MS/MS-Spektren wurden zu pkl-Dateien prozessiert (MassLynx V4.1). Sämtliche pkl-Dateien aus einem Experiment wurden gegen die Swissprot Datenbank (Taxonomie: *Homo Sapiens*) abgeglichen. Insgesamt wurden 446 Proteine signifikant identifiziert. Von diesen konnten anhand der Swissprot-Datenbank-Einträge und der Klassifizierung nach Manning (Manning et al., 2002) 106 Proteine zur Proteinfamilie der Kinasen zugeordnet werden (Abb. III.7).

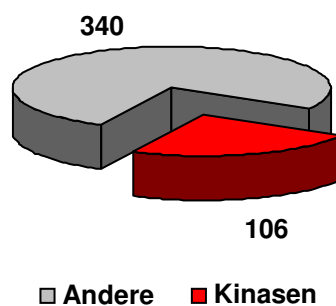


Abb. III.7: Anzahl und Aufteilung der signifikant identifizierten Proteine im Eluat der V16743-Affinitäts-Chromatographie. Von insgesamt 446 identifizierten Proteinen konnten anhand der Swissprot-Datenbank und der Klassifizierung nach Manning 106 (24%) Proteine der Familie der Kinasen zugeordnet werden. 340 (76%) Proteine besitzen keine annotierte Kinase-Aktivität und zeigen keine Homologie zu konservierten Kinase-Domänen.

Die 446 Proteine wurden durch 2296 nicht-redundante tryptische Peptidsequenzen aus einem Massen-Bereich von 800 bis 4800 Da abgedeckt. Die 106 Kinasen (24%) konnten durch 1032 Peptide (45%) und die 340 Proteine ohne Kinase-Aktivität (76%) durch 1264 Peptide (55%) identifiziert werden (Abb. III.8A). Im Durchschnitt wurde

somit eine Kinase mit zehn Peptiden und ein Protein ohne Kinase-Aktivität mit vier Peptiden identifiziert. Zudem war die Spektrenqualität bei den Kinasen besser und erreichte im Mittel einen Mascot Mowse Score von 252, wohingegen Proteine ohne Kinase-Aktivität mit einem durchschnittlichen Score von 108 identifiziert wurden (Abb. III.8B).

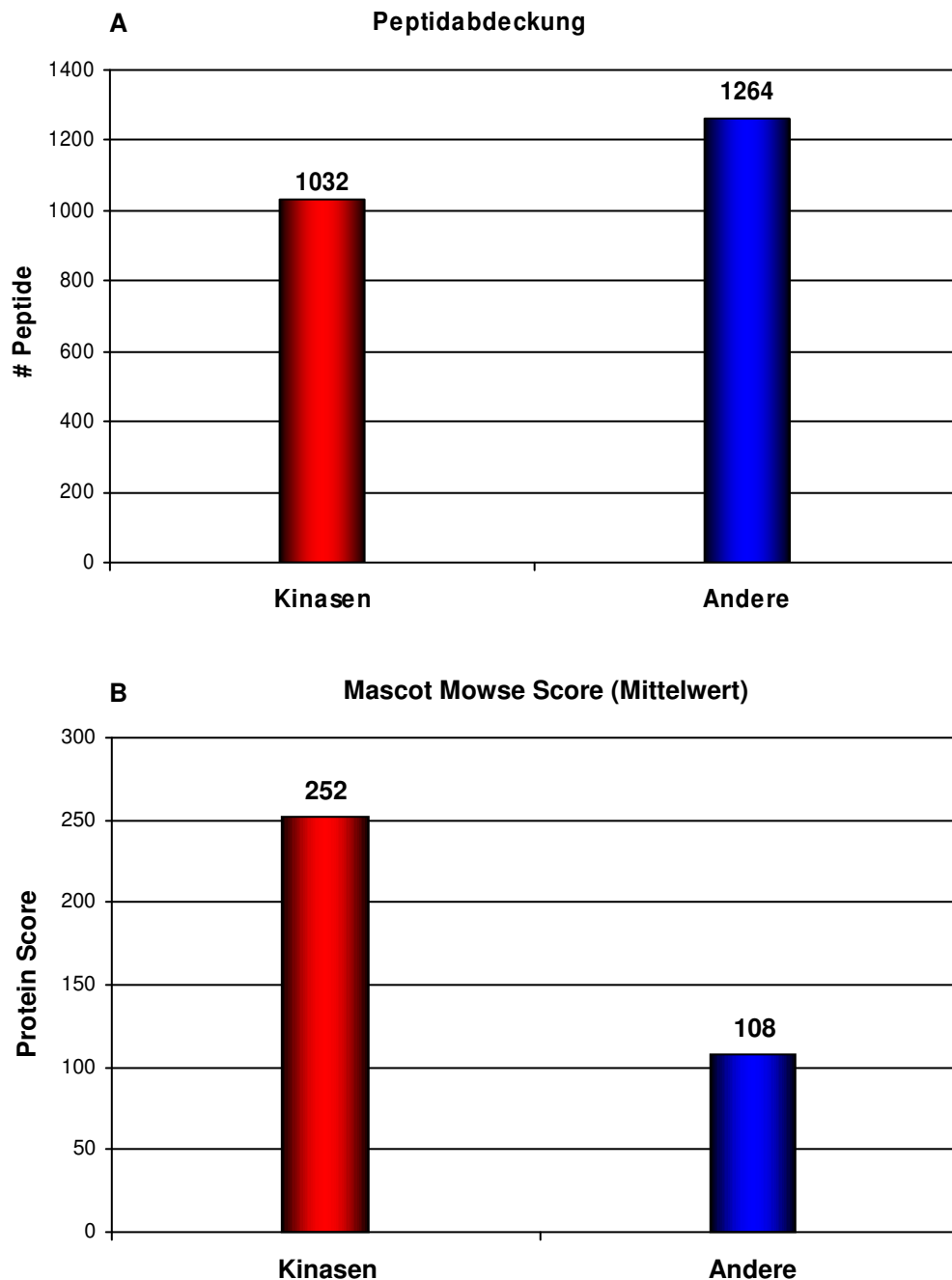


Abb. III.8: Kinasen wurden im Durchschnitt besser identifiziert als Proteine ohne Kinase-Aktivität. (A) 106 Kinasen wurden durch 1032 tryptische Peptide identifiziert, die 340 Proteine ohne Kinase-Aktivität wurden durch 1364 tryptische Peptide abgedeckt. (B) Der Mittelwert des Mascot Mowse Scores betrug 252 für Kinasen und 108 für Proteine ohne Kinase-Aktivität.

49% aller Kinasen wurden in fünf von fünf durchgeführten Experimenten reproduzierbar identifiziert, wohingegen nur 12% der Proteine ohne Kinase-Aktivität in allen fünf Experimenten reproduzierbar detektiert wurden. In mindestens drei von fünf Experimenten konnten immer noch 72% aller Kinasen zugeordnet werden, bei Proteinen ohne Kinase-Aktivität wurden in mindestens drei Experimenten reproduzierbar nur noch 44% identifiziert (Tab. III.2). Diese Ergebnisse verdeutlichen die spezifische Anreicherung von humanen Kinasen aus Gesamt-Zellextrakten über den immobilisierten Kinase-Inhibitor aus der Klasse der Pyridopyrimidine. Die Ko-Reinigung von Proteinen ohne Kinase-Aktivität wird am Ende dieses Kapitels dargestellt.

Tab. III.2: Reproduzierbarkeit der Proteinidentifizierung.

Experimente		Kinasen		Proteine ohne Kinase-Aktivität	
Anzahl		Anzahl	[%]	Anzahl	[%]
mind. 1 von 5		106	100	340	100
mind. 2 von 5		87	82	204	60
mind. 3 von 5		76	72	148	44
mind. 4 von 5		67	63	97	29
mind. 5 von 5		52	49	42	12

Die Klassifizierung der gereinigten Kinasen erfolgte nach (i) Substrat und (II) nach phylogenetischem Verwandtschaftsgrad. 97 der 106 Kinasen übertrugen Phosphat auf Proteine, wohingegen nur neun Kinasen niedermolekulare Substanzen als Phosphat-Akzeptor nutzen (Tab. III.3).

Tab. III.3: Identifizierte Kinasen, die als Phosphat-Akzeptor niedermolekulare Substanzen verwenden.

UniprotKB/Swiss-Prot 51.0 Eintrag	UniprotKB/Swiss-Prot 51.0 Protein Name	EC-Nummer^a
P35790	Cholin Kinase alpha	2.7.1.32
Q9Y259	Cholin/Ethanolamin Kinase	2.7.1.32/2.7.1.82
P27707	Deoxycytidin Kinase	2.7.1.74
Q8NFU5	Inositol polyphosphate multikinase	2.7.1.151
Q9HA64	Ketosamin-3-Kinase	2.7.1.-
O00764	Pyridoxal Kinase	2.7.1.35
P48426	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type-2 alpha	2.7.1.68
P78356	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type-2 beta	
P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	2.7.1.40

a: Schomburg et al., 2004

Von den 97 Proteinkinasen phosphorylieren 77 (79%) die Hydroxylgruppen von Serinen und Threoninen, 16 (17%) waren Tyrosin-spezifische Kinasen und 4 (4%) nutzten Serine, Threonine und Tyrosine als Akzeptor-Aminosäure (Dual-spezifische Kinasen) (Abb. III.9).

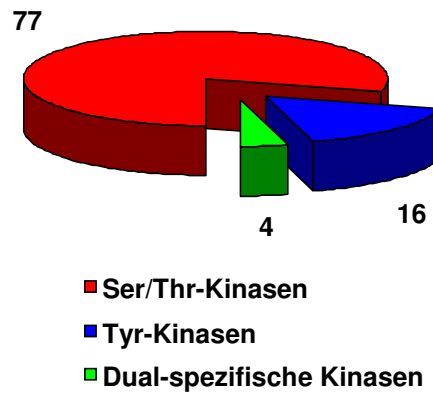


Abb. III.9: Einteilung der identifizierten Proteinkinasen nach Aminosäure-Substrat (UniprotKB/Swiss-Prot 51.0.). 77 der identifizierten Kinasen phosphorylieren Serine (Ser) und Threonine (Thr), 16 Kinasen übertragen Phosphat auf Tyrosine (Tyr) und 4 Kinasen verwenden Serine, Threonine und Tyrosine als Substrat-Aminosäure (Dual-spezifische Kinasen).

Durch Sequenz- und Strukturanalysen der katalytischen Kinase-Domänen und der umliegenden Bereiche sowie durch Analysen der biologischen Funktion (soweit bekannt) konnte für die 518 humanen Proteinkinasen ein phylogenetischer Stammbaum erstellt werden (Manning et al., 2002). Dies führte zur Erweiterung der von Hanks und Hunter (Hanks und Hunter, 1995) aufgestellten fünf Kinase-Gruppen um vier weitere Gruppen. Zusätzlich zu den neun Gruppen der typischen humanen Proteinkinasen werden 40 im humanen Genom kodierte atypische Kinasen gezählt. Atypische Kinasen besitzen kaum oder keine Sequenz-Homologie zu den übrigen 478 typischen humanen Kinasen, sind strukturell eukaryotischen Kinase-Domänen allerdings ähnlich und zeigen z.T. enzymatische Aktivität (Manning et al., 2002). Über die V16743-Affinitäts-Chromatographie konnten Kinasen aus acht der neun Gruppen angereichert werden (Abb. III.10). Kinasen der RGC-Gruppe (Rezeptor-Guanylat-Cyclase) wurden nicht identifiziert. Die höchste Anzahl an gereinigten Kinasen stammt aus der CMGC-Gruppe (CDK, MAPK, GSK3, CLK). Von den Gruppen der Tyrosinkinasen (TK) und Tyrosinkinase-like (TKL) Kinasen wurden 24 Proteine identifiziert. Zwölf Kinasen der STE-Gruppe (Sterile-Homologe Kinasen), drei Kinasen aus der CK1-Gruppe (Casein-Kinase-1), sechs aus der Gruppe der AGC-Kinasen (PKA, PKG, PKC) und zehn Mitglieder der CAMK-Gruppe (Calcium/Calmodulin-abhängige Kinasen) konnten massenspektrometrisch detektiert werden. Zwei Proteine aus der Gruppe der atypischen Kinasen wurden ebenfalls

angereichert. 15 Kinasen konnten keiner der Gruppen nach Manning zugeordnet werden.

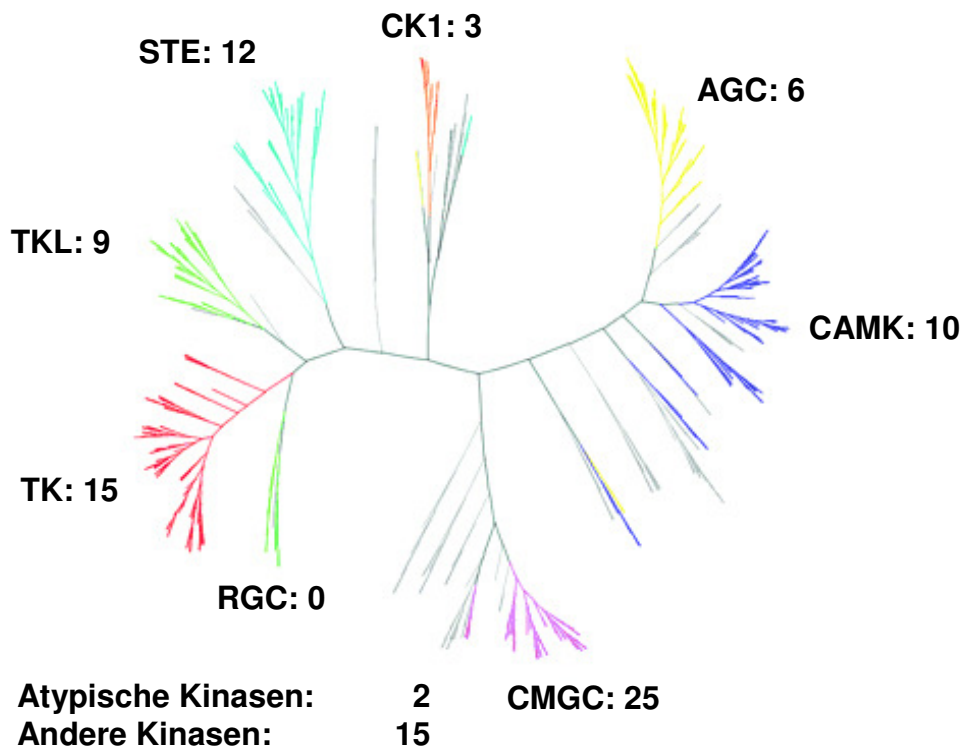


Abb. III.10: Die Klassifizierung der V16743-affinen Proteinkinasen nach dem phylogenetischen Stammbaum von Manning. Insgesamt wurden über V16743-Reinigung 97 Proteinkinasen angereichert. Die Werte geben den absoluten Anteil der 97 Proteinkinasen an der jeweiligen Kinase-Gruppe an. Gruppennamen: AGC: PKA-, PKG-, PKC-Familie; CAMK: Calcium/Calmodulin-abhängige Kinasen; CMGC: CDK-, MAPK-, GSK3-, CLK-Familie; RGC: Rezeptor Guanylat Cyclase-Familie; TK: Tyrosinkinasen; TKL: Tyrosinkinase-like; STE: Homologe der Kinasen Yeast Sterile 7, Sterile 11 und Sterile 20; CK1: Casein-Kinase 1-Familie. Atypische Proteinkinasen: Proteine mit Kinase-Aktivität ohne Sequenzähnlichkeit zur Kinase-Domäne der eukaryotischen Kinasen (Manning, 2004).

In Tab. III.4 sind die prozentualen Anteile der über den Inhibitor V16743 angereicherten Kinasen in Bezug auf den Anteil im humanen Kinom angegeben. Die angereicherten AGC- und atypischen Kinasen deckten 10% und 5% des jeweiligen Anteils im humanen Kinom ab. CAMK-, TK- und Andere Kinasen lagen zwischen 10% und 20%. Die Effizienz der Reinigung für TKL-, CK1- und STE-Kinasen betrug zwischen 20% und 30%. Die Identifizierung von 25 Kinasen aus der CMGC-Familie deckte bereits 41% dieser Familie im humanen Kinom ab. Über alle Kinasen gesehen konnten durch den eingesetzten Inhibitor V16743 unter den gewählten experimentellen Bedingungen in der HeLa S3-Zelllinie 19% aller humanen Kinasen angereichert werden.

Tab. III.4: Prozentuale Anteile der V16743-spezifischen Kinasen am humanen Kinom.

	Aufteilung im humanen Kinom ^a	V16743-affine Kinasen	[%]
CMGC	61	25	41
RGC	5	0	0
TK	90	15	17
TKL	43	9	21
STE	47	12	26
CK1	12	3	25
AGC	63	6	10
CAMK	74	10	14
Atypische Kinasen	40	2	5
Andere Kinasen	83	15	18
Summe	518	97	19

a: Einteilung nach Manning et al., 2002

Die im Kinase-Inhibitor PP58 vorhandene Dichlorphenyl-Gruppe verhinderte die Bindung zu Kinasen mit größeren und hydrophoben GK-Aminosäuren (Blencke et al., 2004). Da nahezu 70% aller humanen Kinasen eine große und hydrophobe GKs besitzen, wurde bei der Syntheseplanung von V16743 auf diese Seitengruppe verzichtet. In Abb. III.11 ist die Verteilung der GK-Aminosäure im humanen Kinom und in den V16743-affinen Proteinkinasen auf Basis einer Sequenz-Analyse dargestellt (Manning et al., 2002).

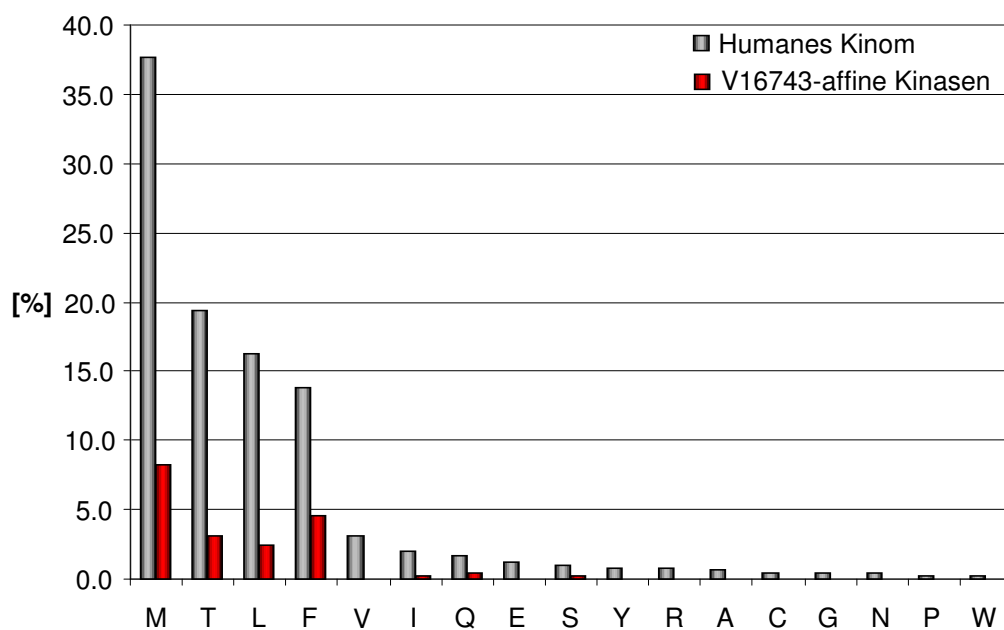


Abb. III.11: Verteilung der Gatekeeper-Aminosäure (GA) unter V16743-affinen Kinasen. Auf Basis von Sequenz-Analysen aller typischen humanen Proteinkinasen wurde der Anteil der proteinogenen Aminosäuren (Einbuchstaben-Code) an der Position der GA bestimmt (grau) und mit allen GA der V16743-affinen Proteinkinasen verglichen (rot).

Im humanen Kinom können an der Stelle des GK bis auf drei (K, H, D) alle proteinogenen Aminosäuren mit unterschiedlicher Verteilung gefunden werden. Hydrophobe Aminosäuren mit großvolumigen Seitenketten an dieser Position wie Methionin, Phenylalanin, Leucin und Isoleucin kommen in ca. 70% aller humanen Kinasen vor. Von den hydrophilen Aminosäuren mit kleinvolumiger Seitenkette stellt Threonin mit 19% im humanen Kinom den größten Anteil dar. Die über V16743-Affinitäts-Chromatographie angereicherten Kinasen besitzen an der Position des GK hydrophobe, großvolumige Aminosäuren wie Methionin (M), Leucin (L), Phenylalanin (F) und Isoleucin (I) und kleinvolumige hydrophile Aminosäuren wie Threonin (T), Serin (S) und Glutamin (Q), wobei Glutamin hydrophile Eigenschaften hat, aber eine größere Seitenkette aufweist (Abb. III.11). Anhand dieses Ergebnisses zeigt sich, dass die Wahl der V16743-Struktur sowohl die Anreicherung von Kinasen mit kleinen hydrophilen wie auch mit großen hydrophoben Aminosäuren an der GK-Position ermöglichte. Über V16743-Affinitäts-Chromatographie wurden 22% von allen im humanen Genom kodierten Kinasen mit großvolumiger GK-Aminosäure angereichert und mit einem mittleren Proteinscore von 275 identifiziert. Von Kinasen mit kleinvolumiger Aminosäure zeigte die Protein-Identifizierung eine geringere Abdeckung von 13% des humanen Kinoms und einen mittleren Proteinscore von 215. Vergleicht man die Verteilung der vier häufigsten GK-Aminosäuren Methionin, Leucin, Phenylalanin und Threonin unter den angereicherten Kinasen und den im humanen Kinom vorkommenden, zeigt sich eine präferentielle Interaktion von V16743 mit Kinasen, die ein Phenylalanin an der Gatekeeper-Position besitzen. Im humanen Kinom tragen 67 Kinasen ein Phenylalanin, davon stammen 42 aus der CMGC-Familie, welche in der Affinitäts-Chromatographie am stärksten angereichert wurde (Tab. III.5).

Tab. III.5: Prozentualer Anteil der vier häufigsten Gatekeeper-Aminosäuren an den V16743-gereinigten Kinasen.

Aminosäure der Gatekeeper-Position	Verteilung im humanen Kinom	Verteilung in den V16743-affinen Kinasen	[%]
M	183	40	22
T	94	15	16
L	79	12	15
F	67	22	33

Trotzdem die Charakterisierung des Substrat-Spektrums von V16743 gezeigt hat, dass eine effiziente Anreicherung von Kinasen aus nahezu allen Gruppen des humanen Kinoms möglich ist, stellte sich die Frage, wieso eine Vielzahl von Proteinen ohne Kinase-Aktivität im Eluat identifiziert werden konnte. Aus diesem Grund wurden diese Proteine in einer Abfrage gegen die UniprotKB/Swiss-Prot-Datenbank 51.0 auf bekannte Domänen zur Bindung von Nukleotidtriphosphaten wie

ATP oder GTP hin analysiert. Nur ein geringer Anteil dieser Proteine war mit einer ATP-Bindungsdomäne (10%) oder einer GTP-Bindungsdomäne (4%) annotiert. 7% der angereicherten Proteine ohne Kinase-Aktivität konnten zu bereits bekannten Kinase-assoziierten Proteinen zugeordnet werden. Neben Zellzyklus-Kinasen regulierenden Cyclinen wie Cyclin-B2 (Zellzyklus-Kinase CDC2) oder Cyclin-T1 (Zellzyklus-Kinase CDK9) konnten verschiedene regulatorische Untereinheiten der 5'-AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK α , AMPK β -2 und AMPK β -1) und Kinase-inhibitorische Proteine wie KCIP-1 (Proteinkinase C Inhibitor Protein 1) identifiziert werden. Neben ATP- und GTP-bindenden und Kinase-assoziierten Proteinen wurden überwiegend Ribosomale Proteine, RNA-bindende Proteine und eine große sehr heterogene Gruppe (43%) an Proteinen angereichert, für die aufgrund ihrer funktionellen Heterogenität eine Klassifizierung nicht mehr sinnvoll erschien (Abb. III.12).

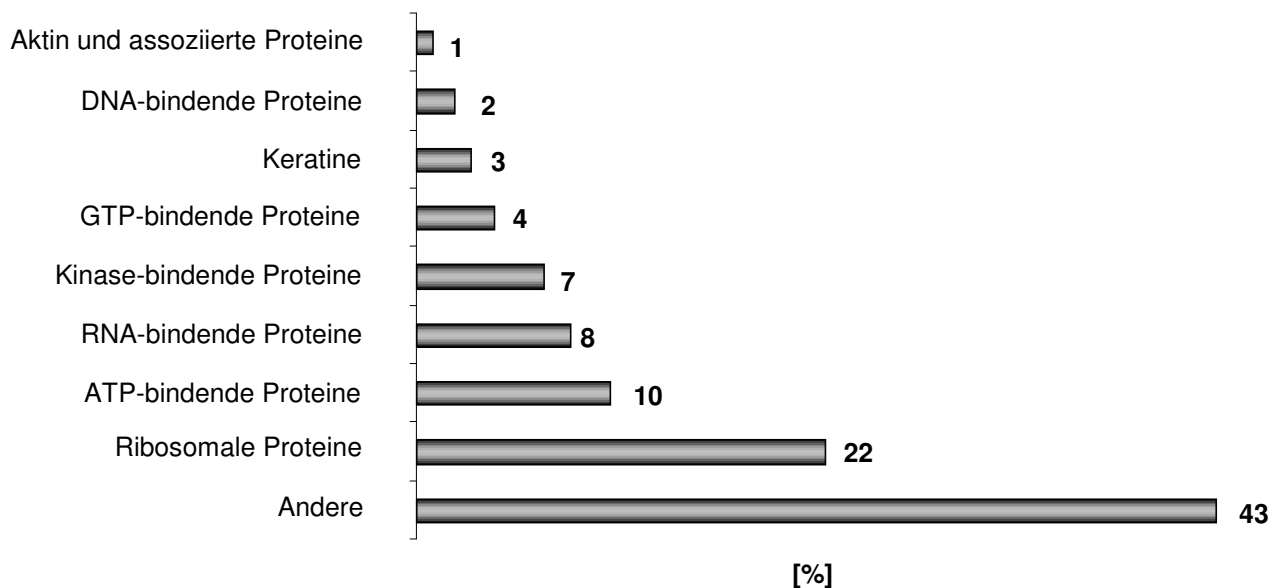


Abb. III.12: V16743-affine Proteine ohne bekannte Kinase-Aktivität. Neben ATP-, GTP- und Kinase-bindenden Proteinen, die möglicherweise durch direkte Interaktion mit dem Inhibitor oder über V16743-bindende Kinasen angereichert wurden, ist die Anreicherung des Großteils der Proteine ohne Kinaseaktivität wahrscheinlich auf unspezifisch Interaktion mit dem Affinitätsmaterial zurückzuführen.

B. Phosphoproteom-Studien an humanen Kinasen

Die ungleiche Stöchiometrie von phosphorylierten zu nicht-phosphorylierten Peptiden in einer komplexen Peptidmischung erschwert die massenspektrometrische Zuordnung von Phosphorylierungs-Stellen erheblich. Eine spezifische Trennung der beiden Peptid-Populationen vor der HPLC-MS/MS-Analyse war deshalb die Voraussetzung für eine effiziente Phosphopeptid-Analytik.

Zu diesem Zweck wurden phosphorylierte Peptide aus der komplexen V16743-Eluatfraktion nach tryptischem Verdau in einem IMAC-Verfahren (Immobilized Metal Affinity Chromatography) durch Interaktion mit immobilisierten dreiwertigen Gallium-Ionen angereichert (Abb. III.1iv). Neben den negativ geladenen Sauerstoff-Atomen der Phosphatgruppe können auch die Carboxylgruppen von Asparagin- und Glutaminsäure an Ga^{3+} -Ionen binden. Um eine möglichst effiziente und reine Anreicherung von phosphorylierten Peptiden zu erreichen, wurde deshalb die Bindung phosphorylierter Peptide in einem exakt definierten pH-Milieu über eine Stunde ermöglicht. Nach ausführlichem Auswaschen nicht-phosphorylierter Peptide erfolgte die Elution der phosphorylierten Peptide unter spezifischen Konditionen durch Zugabe von Ammoniumphosphat. Die Waschlösungen und der Durchlauf eines Experiments wurden als Phosphopeptid-abgereicherte komplexe Peptidmischung in einer Kationenaustausch-Chromatographie weiter aufgetrennt (Abb. III.1v). Die eluierten Phosphopeptid-haltigen Fraktionen wurden durch Umkehrphasen-Chromatographie gereinigt und durch HPLC-MS/MS analysiert. Nach Prozessierung der Rohspektren erfolgte die Auswertung gegen die Swissprot Datenbank. In Abb. III.13 ist ein Ausschnitt aus einem typischen Mascot-Suchergebnis einer HPLC-getrennten und über CID fragmentierten IMAC-Phosphopeptidfraktion gezeigt. Mit dem gewählten Ga^{3+} -IMAC-Verfahren konnten sowohl Serin-, Threonin- und Tyrosin-phosphorylierte Peptide wie auch mehrfach phosphorylierte Peptide sehr effizient angereichert werden. Im Durchschnitt trugen 82% aller gemessenen Peptide eines IMAC-Eluates mindestens eine Phosphatgruppe; 18% der detektierten Peptide waren nicht phosphoryliert, wobei der größte Anteil der unmodifizierten Peptide Asparagin- und/oder Glutaminsäure-haltig war.

1. [AAK1 HUMAN](#) Mass: 101379 Score: 200 Queries matched: 10
AP2-associated protein kinase 1 (EC 2.7.11.1) (Adaptor-associated kinase 1) - Homo sapiens (Human)
☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide	
241	643.30	1284.59	1284.58	0.00	0	44	0.0018	1	K.SAITTPSGSPR.T	+ Phospho (S)
405	759.36	1516.71	1516.72	-0.00	0	40	0.0051	1	K.VGSLTPSPSPK.T 404 407	+ 2 Phospho (S)
523	859.96	1717.91	1717.90	0.01	0	36	0.016	1	K.VQTTPPPAVGQK.V 522	+ Phospho (T)
526	575.60	1723.77	1723.78	-0.01	1	37	0.012	1	K.SKSAITTPSGSPR.T 525 527	+ 2 Phospho (ST)
602	765.08	2292.21	2292.21	0.00	0	44	0.0025	1	K.AGQTQPNPGILPIQPALTPR.K	+ Phospho (T)

2. [PCTK1 HUMAN](#) Mass: 60953 Score: 173 Queries matched: 6
Serine/threonine-protein kinase PCTAIRE-1 (EC 2.7.11.22) (PCTAIRE-motif protein kinase 1) - Homo sa
☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide	
220	422.22	1263.62	1263.68	-0.06	1	31	0.041	1	K.RLSLPADIR.L	+ Phospho (S)
315	702.89	1403.76	1403.73	0.03	0	53	0.00028	1	R.VSLSEIGFGK.L 314	+ Phospho (S)
463	780.92	1559.83	1559.83	0.00	1	38	0.0097	1	R.RVSLSEIGFGK.L 466	+ Phospho (S)
577	657.03	1968.07	1968.07	0.00	0	51	0.0004	1	K.LTLNSPIFDKPLSR.R	+ Phospho (S)

3. [LYN HUMAN](#) Mass: 65635 Score: 148 Queries matched: 8
Tyrosine-protein kinase Lyn (EC 2.7.10.2) - Homo sapiens (Human)
☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide	
343	717.32	1432.63	1432.64	-0.00	0	41	0.0034	1	R.VIEDNEYTAR.E 342 344	+ Phospho (Y)
428	766.37	1530.73	1530.71	0.02	0	66	1.5e-005	1	K.DSLSDDGVDLK.T 429	+ Phospho (S)
563	620.98	1859.92	1859.92	-0.01	1	42	0.0044	1	K.GKDSLSDDGVDLK.T 565 566	+ Phospho (S)

4. [M3K11 HUMAN](#) Mass: 97148 Score: 145 Queries matched: 4
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11 (EC 2.7.11.25) (Mixed lineage kinase 3) (Src-homo
☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide	
269	668.82	1335.62	1335.63	-0.01	0	36	0.011	1	R.GGTVSPPPGTSR.S	+ Phospho (S)
291	690.85	1379.69	1379.69	-0.01	0	42	0.0036	1	R.ITVQASPLDR.R 292	+ Phospho (S)
562	921.93	1841.85	1841.85	0.01	0	67	1.3e-005	1	R.NVFEVGGDSPTEPR.F	+ Phospho (S)

Abb. III.13: Ausschnitt aus einem Mascot-Suchergebnis eines Phosphopeptid-angereicherten IMAC-Eluates. Die durch Mascot zugeordnete(n) Phosphorylierungs-Stelle(n) sind in der jeweiligen Peptidsequenz unterstrichen. Im Durchschnitt konnten in über 80% der identifizierten Peptide nach Ga^{3+} -IMAC-Anreicherung eine Phosphorylierungs-Stelle identifiziert werden. Sowohl einfach- wie auch mehrfach-phosphorylierte Peptide wurden identifiziert

Insgesamt konnten nach IMAC-Fraktionierung und der Auswertung von mehreren Tausend MS/MS-Spektren 231 Phosphorylierungs-Stellen in Proteinen der V16743-Affinitäts-Chromatographie-Eluate identifiziert werden. 72% (166) der Phosphorylierungs-Stellen stammten von Kinasen und 28% (65) von Proteinen ohne Kinase-Aktivität. Mit 164 detektierten Phosphorylierungen war die häufigste modifizierte Aminosäure Serin. An Threoninen wurden 55 und an Tyrosinen zwölf Phosphorylierungs-Stellen zugeordnet. Die Aufteilung auf die Enzymklasse der Kinasen und auf Proteine ohne Kinase-Aktivität ist in Abb. III.14 dargestellt.

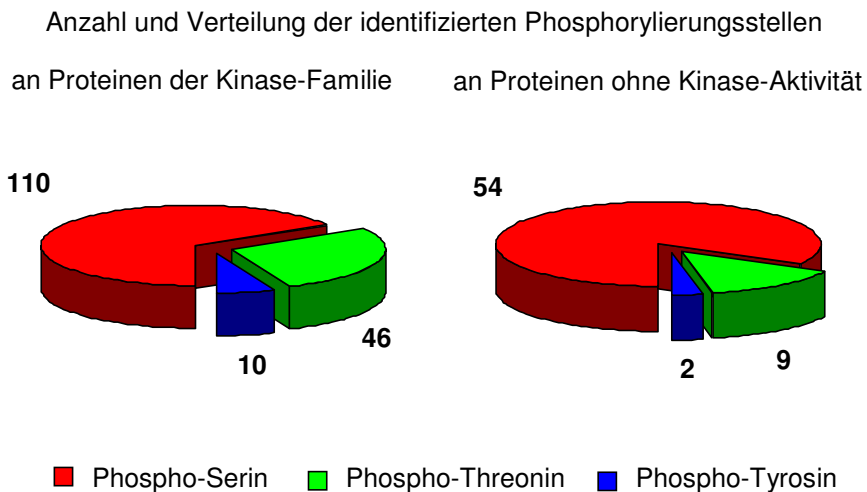


Abb. III.14: Anzahl und Verteilung der Phosphorylierungs-Stellen, die in Proteinen der Kinase-Familie (links) bzw. in Proteinen ohne Kinase-Aktivität (rechts) identifiziert wurden. Es wurden signifikant mehr Phosphorylierungs-Stellen in Kinasen identifiziert als in Proteinen ohne Kinaseaktivität.

In einem umfassenden Datenbank-Abgleich wurden die experimentell identifizierten Phosphorylierungen auf bislang nicht bekannte Phosphorylierungs-Stellen untersucht. Als Vergleichsgrundlage wurden die korrespondierenden Proteineinträge der vier Datenbanken Phosida (Olsen et al., 2006), Phospho.ELM 6.0 (Diella et al., 2004), Phosphosite (www.phosphosite.org) und Uniprot 10.3 (www.expasy.uniprot.org) herangezogen. Von den 231 analysierten waren 97 Phosphorylierungsstellen in keiner der vier Datenbanken eingetragen und wurden somit in dieser Arbeit erstmals identifiziert. Davon gehörten 68 zu Proteinen der Kinase-Familie und 29 zu Proteinen ohne Kinase-Aktivität.

2. Die N-terminale Variante InlB₃₂₁ als funktioneller c-Met-Ligand

Die Charakterisierung differentieller Phosphorylierungen an humanen Kinasen im InlB-stimulierten c-Met Signalweg durch die vorgestellte experimentelle Strategie (Abb. III.1) erforderte ein geeignetes Perturbations-System. Voraussetzung für die Wahl der Zell-Linie war (i) eine hohe c-Met-Proteinexpression und (ii) eine starke Signal-Antwort auf die Aktivierung von c-Met. Zwei humane Zell-Linien wurden in Westernblot-Analysen auf diese Eigenschaften hin miteinander verglichen: die nach HGF/SF-Stimulation hochmotile epitheliale Prostata-Karzinom-Linie DU-145 (Wells et al., 2005) und die bereits zur Charakterisierung der InlB-vermittelten Invasion eingesetzte epitheliale Cervix-Karzinom-Linie HeLa S3 (Braun et al., 1998). Da die spezifische Signalweiterleitung des c-Met-Rezeptors im Fokus der Experimente stand, wurde in den Induktionsexperimenten ein Derivat des *listeriellen* Virulenzfaktors InlB eingesetzt (Abb. III.15): dieses bestand aus der N-terminalen Cap-Domäne (Cp), den Leucin-reichen Sequenzen (LRR) und dem C-terminal folgenden Interrepeat (IR).

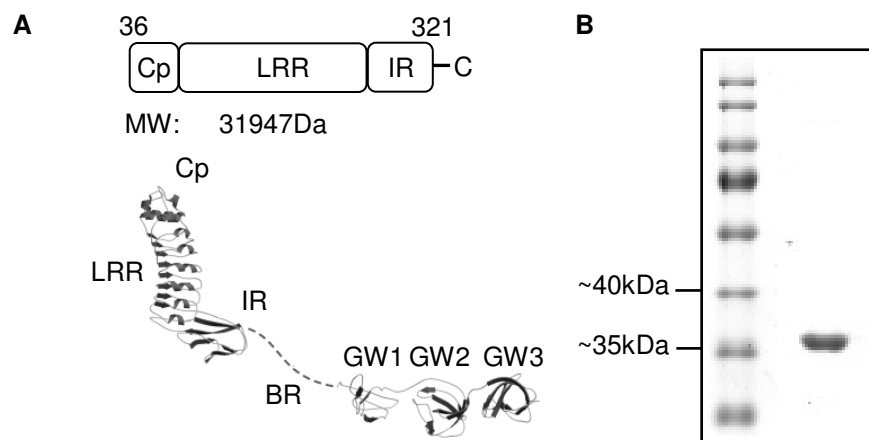


Abb. III.15: Rekombinant hergestelltes InlB₃₂₁. (A) Die Leucin-reichen Domänen (LRR) und der Inter-Repeat (IR) von Internalin B binden an die c-Met-SEMA-Domäne und sind ausreichend zur Aktivierung von c-Met (Niemann et al., 2007; Banerjee et al., 2004). (B) Das im pGEX-6P-1-Vektorsystem in *E.coli* BL21 rekombinant hergestellte InlB₃₂₁ wurde über Affinitäts- und Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt und zeigte keinerlei Neben- oder Abbauprodukte.

Durch die Verwendung dieses Konstruktes wurde gewährleistet, dass nur die c-Met-Signalkaskade aktiviert und keine zusätzliche Signaltransduktion durch Interaktion der GW-Module des nativen InlB mit gC1q-R (Braun et al., 2000) oder anderen bislang unbekannten Oberflächenproteinen ausgelöst wurde. Die rekombinante

Expression des InlB-Derivats, InlB₃₂₁, erfolgte in *E.coli BL21* über das pGEX-6-P1-Vektorsystem. Nach Zelllyse wurde das N-terminale GST-InlB₃₂₁-Fusionsprodukt über Glutathion-Sepharose angereichert, der GST-Anteil durch Zugabe von Precision-Protease von InlB₃₂₁ abgespalten und eine finale Aufreinigung über eine Anionenaustauscher-Säule durchgeführt. Das gegen PBS dialysierte Endprodukt wurde sterilfiltriert, aliquotiert und bis zum Einsatz bei -20°C gelagert. Abb. III.15 zeigt schematisch die Domänenstruktur von InlB₃₂₁ und den dreidimensionalen Aufbau des Wildtyp-Proteins. Im Coomassie-angefärbten PA-Gel wurden 2µg des InlB-Derivats aufgetrennt. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 31947Da (ProtParam, ExPASy) und zeigt keinerlei Verunreinigungen oder Abbau-Produkte.

A. c-Met-Expression und -Aktivierung in den humanen Zelllinien HeLa S3 und DU-145

In Westernblot-Analysen wurde zunächst charakterisiert, welche der beiden Zelllinien HeLa S3 oder DU-145 ein höheres Proteinexpressions-Niveau von c-Met aufweist. Hierfür wurden semikonfluente Zellen beider Linien lysiert, die Lysate in einem 10%igen PA-Gel aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von c-Met erfolgte mit dem α-c-Met Antikörper C-12 (Santa Cruz

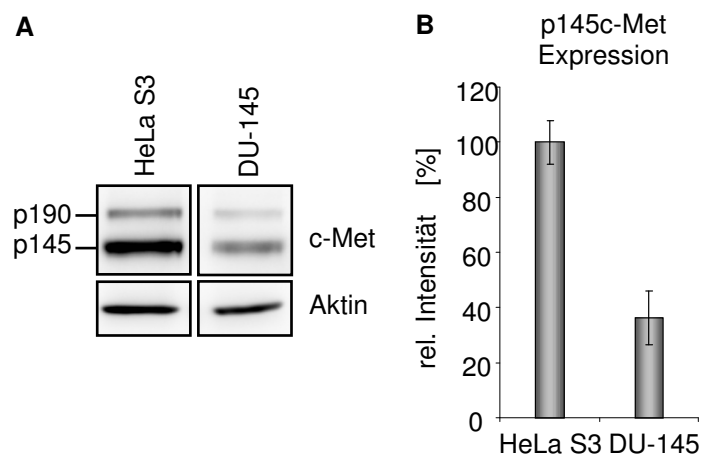


Abb. III.16: c-Met wird in HeLa S3- und DU-145-Zellen exprimiert. (A) Westernblot-Analyse der c-Met-Expression in Lysaten aus semikonfluente HeLa S3- und DU-145-Zellen. Der α-c-Met-Antikörper bindet am C-Terminus von c-Met und markiert die unprozessierte Form (p190) und die β-Kette der prozessierten Form (p145). Als Ladungskontrolle wurden die Westernblots mit einem α-Aktin-Antikörper detektiert. (B) Die relative Quantifizierung der p145-c-Met-Signalstärke aus (A) in HeLa S3- und DU-145-Zellen zeigt eine deutlich höhere c-Met-Expression in HeLa S3-Zellen (n=4).

Biotechnology, Inc.), der ein C-terminales c-Met-Epitop erkennt. In beiden Zelllinien konnte die nicht-prozessierte 190kDa-große c-Met-Proform und die 145kDa große β-Kette des prozessierten c-Met-Rezeptors nachgewiesen werden (Abb. III.16A). Das Verhältnis von prozessiertem heterodimeren c-Met (repräsentiert durch die β-Kette) zu unreifer 190kDa-Variante betrug in beiden Zelllinien gleichermaßen ca. 3:1. Nach Normalisierung auf zelluläres Aktin wurden die Signale der c-Met β-Kette in beiden Zelllinien densitome-

trisch quantifiziert und miteinander verglichen. Die HeLa S3-Zelllinie besitzt unter den gegebenen Kulturbedingungen nahezu dreimal mehr prozessiertes c-Met als die DU-145-Zelllinie, die im Mittel nur ca. 36% der p145-c-Met-Signalstärke der HeLa S3-Linie erreichte (Abb. III.16B).

Die Aktivierung der Tyrosinkinase-Domäne korreliert mit der Autophosphorylierung der beiden Tyrosine Y¹²³⁴ und Y¹²³⁵ von c-Met. Da die HeLa S3-Linie ein dreifach stärkeres c-Met-Expressions-Niveau als die DU-145-Linie zeigt, wurde charakterisiert, ob dementsprechend mehr c-Met nach InlB₃₂₁-Stimulation in der HeLa S3-Linie autophosphoryliert wird. Hierfür wurden beide Zelllinien bei Erreichen eines semikonfluenten Zustandes acht Stunden in Serum-freiem Medium konditioniert und anschließend mit 10nM InlB₃₂₁ für vier Minuten stimuliert. Nach Zelllyse, Auftrennung der Proteine in einem 10%igen PA-Gel und Transfer auf eine PVDF-Membran wurde die Autophosphorylierung mit einem Antikörper detektiert, der spezifisch die phosphorylierten Tyrosine Y¹²³⁴ und Y¹²³⁵ erkennt (Abb. III.17A).

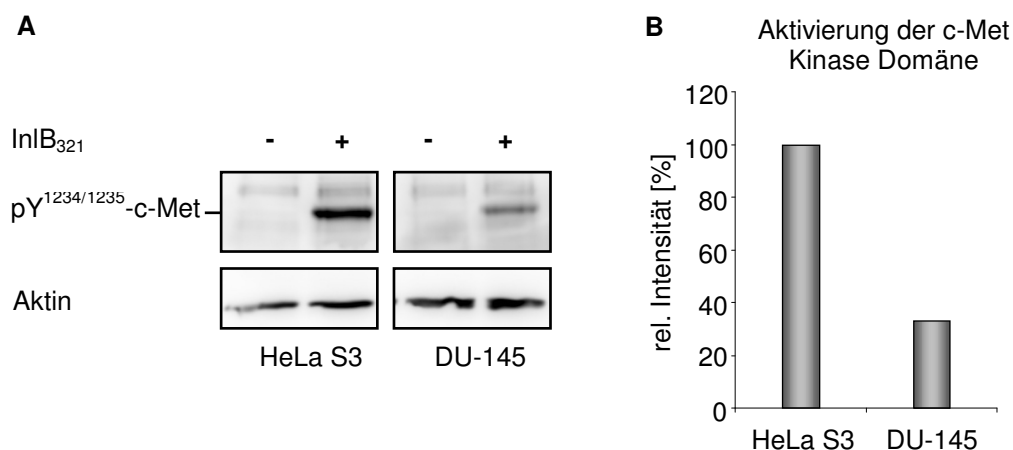


Abb. III.17: Die Aktivierung von prozessiertem c-Met durch InlB₃₂₁ in den Zelllinien HeLa S3 und DU-145. (A) Nach achtstündiger Inkubation in Serum-freiem Medium wurden beide Zelllinien mit 10nM InlB₃₂₁ für vier Minuten stimuliert. Die Aktivierung der c-Met-Kinase-Domäne korreliert mit der Autophosphorylierung der beiden Tyrosine Y¹²³⁴ und Y¹²³⁵, die im Westernblot mit einem spezifischen Antikörper detektiert wurden. (B) Nach Normalisierung auf zelluläres Aktin wurden die pY^{1234/1235}-Signale aus (A) densitometrisch quantifiziert.

Durch die achtstündige Konditionierung in Serum-freiem Medium wurde erreicht, dass in beiden Zelllinien c-Met im inaktiven Zustand vorliegt. Erst nach Präsentation von InlB₃₂₁ konnte die Phosphorylierung der beiden Tyrosine in der c-Met- β -Kette nachgewiesen werden. Nach Normalisierung auf zelluläres Aktin wurden die Phosphotyrosin-Signale beider Zelllinien densitometrisch quantifiziert. Die Signalstärke betrug in der DU-45-Linie nur ca. 30% des gemessenen Signals in der

HeLa S3-Linie (Abb. III.17B). Im Vergleich mit der Differenz in der Proteinexpression (Abb. III.16) lässt sich ableiten, dass in beiden Zelllinien die Autophosphorylierung von c-Met nach InIB-Stimulation gleich effizient ist. Da HeLa S3 ein höheres Grundniveau von c-Met besitzt, wurde diese Zelllinie für die quantitativen Studien differentieller Phosphorylierungen an Kinasen eingesetzt.

B. Zeitabhängige Aktivierung von Kinasen im c-Met-Signalweg

Aus publizierten Studien ist bekannt, dass die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges (Copp et al., 2003) und des PI3K/Akt1(PKB)-Signalweges (Ireton et al., 1996) eine fundamentale Bedeutung in der InIB-stimulierten c-Met-Signalkaskade einnehmen. Um einen geeigneten Induktions-Zeitpunkt für die quantitative Charakterisierung von Phosphorylierungen an Kinasen im InIB-c-Met-Signalweg zu definieren, wurden zeitabhängige Induktionsexperimente im Hinblick auf die Aktivierung der Mek- und Erk-Kinasen (Markerenzyme des MAP-Kinase-Signalweges) und der Akt1(PKB)-Kinase (Markerenzym für den PI3K/Akt1(PKB)-Signalweg) durchgeführt. Hierfür wurden semikonfluente HeLa S3-Zellen acht Stunden unter Serum-freien Bedingungen konditioniert und anschließend in einer Zeitreihe mit 10nM InIB₃₂₁ stimuliert. Nach Zellyse, Trennung der Proteine in einem 10%igen PA-Gel und Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde die Aktivierung dieser Kinasen mit spezifischen Antikörpern detektiert. Für die Detektion der c-Met-Aktivierung wurde der bereits erwähnte Antikörper gegen die beiden phosphorylierten Tyrosine Y¹²³⁴ und Y¹²³⁵ in der Kinase-Domäne eingesetzt. Die Aktivierung der MAPK-Kinasen Mek1 und Mek2 korreliert mit der Phosphorylierung der Serine S²¹⁷ und S²²¹ (Mek1, 43kDa) bzw. S²²² und S²²⁶ (Mek2, 44kDa) in der Kinase-Domäne. Die durch die Mek-Kinasen vermittelte Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 wird durch die Phosphorylierung von T²⁰¹ und Y²⁰³ (Erk1, 44kDa) bzw. T¹⁸⁴ und Y¹⁸⁶ (Erk2, 42kDa) in der Kinase Domäne angezeigt. Die Aktivierung der Kinase Akt1(PKB) (56kDa) erfordert die Rekrutierung an die Plasmamembran durch Interaktion der PI3K-Produkte PI(3,4,5)P₃ und PI(3,4)P₂ mit der PH (Pleckstrin-Homologie)-Domäne von Akt1(PKB) (Franke et al., 1997) und die simultane Phosphorylierung des Threonins T³⁰⁸ und des Serins S⁴⁷³. Eine Inhibierung der PI3-Kinase interferiert mit der Akt1(PKB)-Aktivierung (Scheid et al., 2002). Als Marker der Kinase Akt1(PKB) wurde ein gegen das phosphorylierte Serin S⁴⁷³ spezifischer Antikörper eingesetzt.

Für die Liganden-Präsentation wurde ein kurzer Zeitrahmen von 120, 240, 360 und 480 Sekunden gewählt, um möglichst früh ablaufende Prozesse nach InIB-c-Met-Interaktion zu charakterisieren. Durch das eingesetzte N-terminale InIB₃₂₁-Derivat,

welches nur c-Met binden und aktivieren kann, wurden alle erwähnten Marker-Enzyme aktiviert (Abb. III.18A).

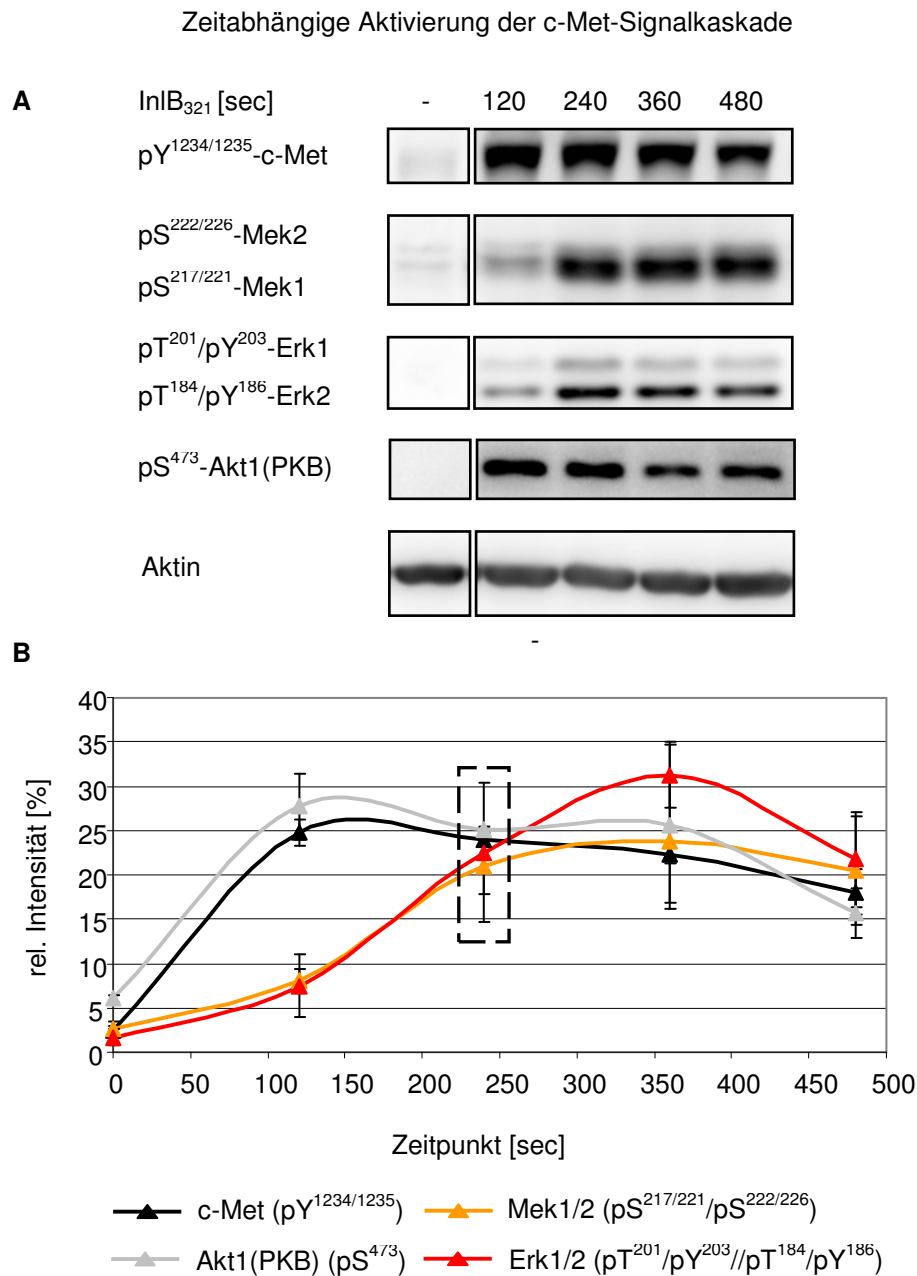


Abb. III.18: Das InIB-Derivat InIB₃₂₁ aktiviert den MAP-Kinase- und den PI3K/Akt1(PKB)-Signalweg in der c-Met-Signalkaskade. (A) Zeitaufgelöste Westernblot-Analysen nach InIB₃₂₁-Induktion (10nM, angegebene Zeitpunkte). Mek1 und Mek2 sowie Erk1 und Erk2 wurden nach Stimulation in der jeweiligen Kinase-Domäne phosphoryliert und dadurch aktiviert. Zur Bestimmung der Aktivität von Akt1(PKB) wurde die Phosphorylierung des Serins S⁴⁷³ am C-Terminus visualisiert. (B) Nach Normalisierung auf zelluläres Aktin wurden die Signalstärken der Phosphorylierungen nach zeitaufgelöster InIB₃₂₁-Stimulation densitometrisch quantifiziert. c-Met und Akt1(PKB) sind schneller aktiviert als Mek1/2 und Erk1/2. Der 4-Minuten-Zeitpunkt (gestrichelte Markierung) wurde für die quantitativen Phosphokinom-Studien ausgewählt (c-Met, Akt1(PKB) und Erk1/2: n=3; Mek1/2: n=2).

Durch Quantifizierung der Antikörper-Signale nach Normalisierung auf zelluläres Aktin konnte die zeitliche Dynamik der Kinase-Aktivierung beurteilt werden (Abb. III.18B). Die c-Met Signalkaskade wird innerhalb der ersten beiden Minuten nach Liganden-Präsentation aktiviert. Die Phosphorylierung von c-Met und Akt1(PKB) erfolgt nach dem gleichen zeitlichen Muster und besitzt ein Maximum nach bereits zwei Minuten. Daraus lässt sich folgern, dass die Signalübertragung von c-Met über die PI3-Kinase zu Akt1(PBK) äußerst schnell abläuft. Die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade nach c-Met-Aktivierung ist im Vergleich zur c-Met- und Akt1(PKB)-Aktivierung leicht verzögert. Die Aktivitätsmaxima von Erk1/2 und Mek1/2 liegen bei sechs Minuten nach Liganden-Präsentation. Das Verhalten der Kinasen Mek1/2 und Erk1/2 im Hinblick auf Phosphorylierung der Kinase-Domänen verläuft nach demselben zeitabhängigen Schema. Für die Aktivität der charakterisierten sechs Kinasen erkennt man aus dem Kurvenverlauf der Quantifizierung bereits eine leichte Abnahme der relativen Signalintensität nach achtminütiger Stimulation. Trifft man die Annahme, dass die Liganden-Konzentration über den gesamten Stimulations-Zeitraum stabil bleibt, kann man aus diesem Ergebnis ableiten, dass der Prozess der c-Met-Signalkaskaden-Aktivierung nach InIB₃₂₁-Präsentation wahrscheinlich auf einen engen Zeitraum begrenzt ist.

Für die quantitative Charakterisierung von Phosphorylierungen an Kinasen im InIB₃₂₁-c-Met-Signalweg wird der vierminütige Stimulations-Zeitpunkt gewählt (Abb. III.18B). Hierdurch soll sichergestellt werden, dass möglichst früh auftretende Ereignisse in der c-Met-Signalkaskade charakterisiert werden. Die relative Aktivierung der in den Westernblot-Analysen charakterisierten Kinasen ist zu diesem Zeitpunkt miteinander vergleichbar.

3. Quantitative Phosphokinom-Analysen im InlB₃₂₁-c-Met-Signalweg

Nachdem durch Westernblot-Analysen für ein geeignetes Perturbations-System sowohl die Zelllinie HeLa S3 als auch eine vierminütige Stimulation mit InlB₃₂₁ ausgewählt wurde, wurden nach Abb. III.1 drei unabhängige Experimente zur quantitativen Charakterisierung differentieller Phosphorylierungen an humanen Kinasen im InlB₃₂₁-c-Met-Signalweg durchgeführt. Hierfür wurden auf **50** 15cm-Zellkulturschalen je $3 \cdot 10^6$ HeLa S3-Zellen ausgebracht. Nach Erreichen eines adhärennten Zustandes wurden die semikonfluenten Zellen in Serum-freiem Medium konditioniert. **25** der 50 Zellkulturschalen wurden für vier Minuten mit 10nM InlB₃₂₁ stimuliert, während die übrigen **25** Zellkulturschalen unbehandelt blieben. Die Anreicherung von Kinasen aus den nach Induktion hergestellten Gesamt-Zellextrakten erfolgte für beide Ansätze (Stimulation, Kontrolle) parallel durch Affinitäts-Chromatographie mit V16743-ECH-Sepharose-4B gepackten Tricorn 5/50-Säulen. Nach intensiven Waschschritten wurden die gebundenen Proteine unter denaturierenden Bedingungen eluiert. Von jeder Eluat-Fraktion wurde ein Aliquot in einem 12%igen PA-Gel aufgetrennt, um Protein-reiche Fraktionen zu bestimmen. Nach Anfärbung der Gele mit Coomassie-Lösung wurden je Ansatz Protein-haltige Fraktionen vereint und die Proteine durch das Chloroform/Methanol-System gefällt. Nach tryptischem Verdau wurden die resultierenden Peptide beider Ansätze mit je einem iTRAQTM-Reagenz mit unterschiedlich schwerem Reporter (114, 115, 116 oder 117Da) an den N-Termini und an gegebenenfalls zusätzlich vorhandenen C-terminalen Lysinen markiert. Anschließend wurden beide Peptid-Ansätze vereint. In der folgenden Ga³⁺-basierten Affinitäts-Chromatographie erfolgte die Trennung phosphorylierter Peptide von nicht-phosphorylierten Peptiden. Die phosphorylierten Peptide wurden direkt über RP-LC-MS/MS fragmentiert, während die nicht-phosphorylierten Peptide aufgrund ihrer höheren Komplexität durch eine Kationenaustausch-Chromatographie vorfraktioniert wurden, bevor eine RP-LC-MS/MS-Analyse der einzelnen Fraktionen durchgeführt wurde. Die Auswertung der erhaltenen Rohspektren erfolgte nach Prozessierung (MassLynx) durch einen Abgleich gegen die Swiss-Prot-Datenbank. Die Zuordnung von Phosphorylierungen wurde durch manuelle Kontrolle der Rohspektren verifiziert. Über die in der Arbeitsgruppe Zelluläre Proteomforschung (Dr. L. Jänsch, HZI) entwickelte Software iTRAQassist (Doktorarbeit Claudia Hundertmark) wurden sämtliche Datensätze einer Regulationsanalyse unterzogen. Regulierte Peptiddaten wurden erneut durch manuelle Durchsicht der Rohspektren überprüft.

A. Analyse von Peptidregulationen

Die Analyse der relativen Anwesenheit eines Peptides in der InIB₃₂₁-stimulierten Probe zum Kontrollansatz wurde durch einen Vergleich der Signalintensitäten der verwendeten iTRAQTM-Reporter ermöglicht. Während der Fragmentierung einer Peptidmuttermasse zerfielen Peptide in Sequenz- und Modifikations-spezifische Teilmoleküle. Diese sogenannten Ionenserien geben Aufschluss über die Aminosäuresequenz eines Peptides und vorhandene Modifikationen. Zusätzlich wurden die iTRAQTM-Reagenzien in Balancer- und Reporter-Gruppe gespalten. Während die neutrale Balancer-Gruppe nicht detektiert wurde, enthielt jedes Fragmentionen-Spektrum die spezifischen Massen der eingesetzten Reporter-Gruppen.

Die Regulationsanalyse wird exemplarisch an Peptiden der Kinase GSK3A gezeigt (Abb. III.19 und III.20).

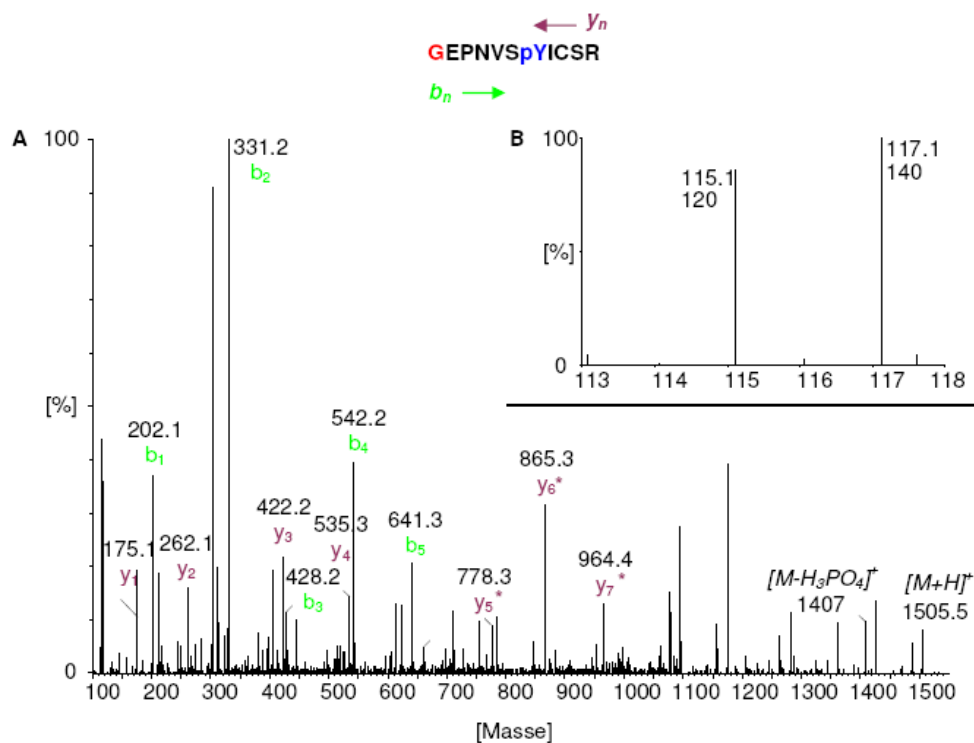


Abb. III.19: Fragmentationenspektrum des Tyrosin-phosphorylierten Peptides GEPNVSpYICSR der Kinase GSK3A. (A) Die durch Fragmentierung gebildete spezifische y- und b-Ionenserie ermöglichte die Peptid-Identifizierung und die Zuordnung der Phosphat-tragenden Aminosäure zum Tyrosin (y₅, y₆, y₇, mit Stern markiert). (B) Im Ausschnitt des Fragmentationenspektrums sind die Reporter-Massen der fragmentierten iTRAQTM-Reagenzien und deren Intensitäten dargestellt. Die Peptide des Kontroll-Ansatzes wurden mit dem Reporter der Masse 115Da, die Peptide des InIB₃₂₁-induzierten Ansatzes mit dem Reporter der Masse 117Da markiert. Durch Vergleich der Intensitäten war eine relative Quantifizierung möglich. Das gezeigte Peptid war nicht reguliert (rot: iTRAQTM-markiertes Glycin).

In Abb. III.19A ist ein Spektrum der Peptidmuttermasse 1504.5 dargestellt. Durch die charakteristischen Massen der b- und y-Fragmentationen konnte die Aminosäuresequenz bestimmt und das Peptid zur Proteinkinase GSK3A zugeordnet werden. Die Massen der Fragmentationen der y-Serie y_5 , y_6 und y_7 (Abb. III.19, mit Stern markiert) führten zur Identifizierung des Tyrosins als Phosphat-tragende Aminosäure. In Abb. III.19B ist der untere Massenbereich des Spektrums vergrößert dargestellt, in dem die iTRAQTM-Reporter detektiert wurden. Die Peptide der InIB₃₂₁-stimulierten Probe wurden mit dem Reporter der Masse 117Da, die des Kontroll-Ansatzes mit dem Reporter der Masse 115Da markiert. Durch Vergleich der einzelnen Reporter-Intensitäten konnte für dieses Peptid ein relativer Regulations-Wert von 1.2 bezogen auf die Kontroll-Probe bestimmt werden. Das Tyrosin-phosphorylierte Peptid GEPNVSpYICSR war somit nicht reguliert nach vierminütiger InIB₃₂₁-Behandlung der HeLa S3-Zellen. Als Beispiel für eine Regulation wurde ein weiteres phosphoryliertes Peptid der Kinase GSK3A ausgewählt (Abb. III.20).

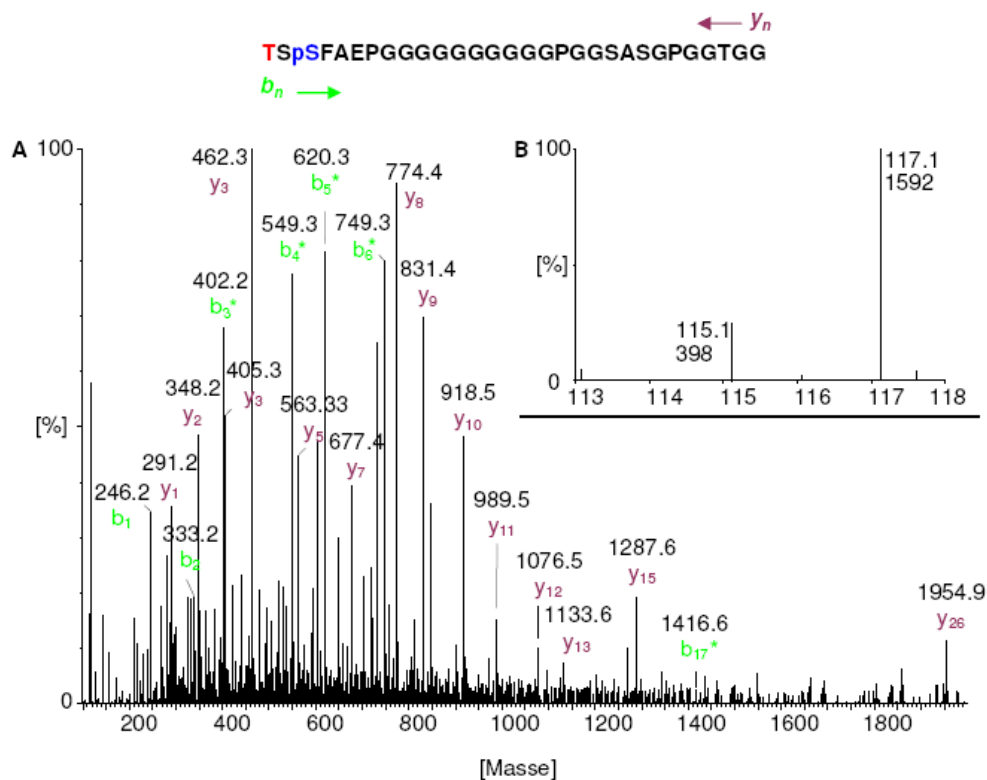


Abb. III.20: Fragmentionen-Spektrum des Serin-phosphorylierten Peptides TSpSFAEPGGGGGGGGGGPGGSASGPGGTGG der Kinase GSK3A. (A) Peptid-Identifizierung und Zuordnung der Phosphorylierung zu Serin 3 (pS) durch das spezifische Muster der Fragmentationen. Die mit einem Stern markierten Fragmentationen tragen die Masse von Dehydroanilin, dem Zerfallsprodukt von phosphoryliertem Serin (rot: iTRAQTM-markiertes N-terminales Threonin). (B) Der vergrößerte Ausschnitt des Spektrums zeigt die Reporter-Massen 115Da (Kontrolle) und 117Da (InIB₃₂₁-Stimulation) der fragmentieren iTRAQTM-Reagenzien und deren Intensitäten. Der relative Intensitäts-Vergleich ergibt eine Peptidregulation von 4 bezogen auf das Peptid der Kontroll-Probe.

Das Peptid mit der Sequenz TS**p**SFAEPGGGGGGGGGGPGGGSASGPGGTGG trug eine Phosphat-Gruppe am Serin 3 (pS). Durch die mit einem Stern markierten Fragmentationen sind die spezifischen Massen der Peptidfragmente markiert, die Dehydroanilin, das Zerfallsprodukt von phosphoryliertem Serin, enthielten. Im niederen Massenbereich (Abb. III.20B) wurden die Intensitäten der iTRAQTM-Reporter ausgelesen. Das Verhältnis der Intensitäten der Reporter mit den Massen 117Da (InIB₃₂₁-stimulierte Probe: 1592) zu 115Da (Kontroll-Probe: 398) zeigte eine Regulation von 4 bezogen auf die Kontrollprobe.

Da in einem einzigen Stimulationsexperiment mehrere 1000 MS/MS-Spektren aufgezeichnet wurden, war eine manuelle Regulationsanalyse wie in Abb. III.19 und III.20 gezeigt nicht mehr möglich. Die automatische Analyse von Peptidregulationen wurde durch das Programm iTRAQassist durchgeführt, welches mit statistischen Methoden die systematische Auswertung von iTRAQTM-Daten ermöglicht und die Ergebnisse graphisch darstellt. iTRAQassist ermittelt die durchschnittliche Intensität der gemessenen Reporter-Signale aller Peptide eines Experimentes und normalisiert jeden einzelnen Reporter auf diesen Wert. Weiterhin korrigiert iTRAQassist die Reporter-Intensitäten im Hinblick auf Isotopen-Unreinheiten und bewertet die kalkulierten Regulationsfaktoren anhand von sog. Rausch-Parametern.

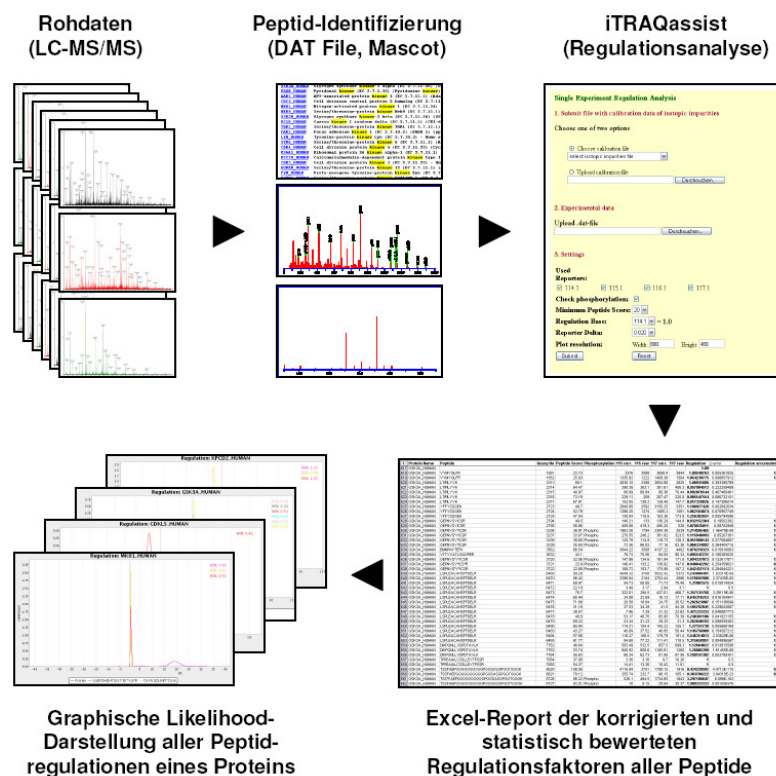


Abb. III.21: Flussdiagramm der Regulationsanalyse iTRAQTM-markierter Peptide durch das Programm iTRAQassist.

Als Eingabe-Datensatz nutzt iTRAQassist das von Mascot generierte DAT-File, indem sämtliche Daten der Peptidsequenzierungen und der zugehörigen Reporter-Intensitäten abgelegt sind. Nach Kalkulation der Regulationswerte aller durch Mascot identifizierten Peptide eines jeden Proteins werden diese in einer Excel-Tabelle aufgeführt (Abb. III.21). Die Regulationsfaktoren nicht phosphorylierter Peptide eines Proteins werden zu einem Protein-spezifischen Regulationsfaktor zusammengefasst. Die Regulationsfaktoren phosphorylierter Peptide werden gesondert aufgeführt. Für jedes Protein und seine phosphorylierten Peptide wird anhand einer Maximum-Likelihood-Abschätzung die Höhe und Glaubwürdigkeit der Regulation graphisch dargestellt. In Abb. III.22 ist exemplarisch die graphische Darstellung einer Regulationsanalyse von GSK3A nach vierminütiger InIB₃₂₁-Stimulation gezeigt. Aus allen nicht-phosphorylierten Peptiden wurden für das Protein ein wahrscheinlichster Regulationsfaktor von 1.1 ermittelt. Drei phosphorylierte Peptide wurden identifiziert, wobei die phosphorylierte Aminosäure in Abb. III.22 durch einen rechts-seitigen Stern in der jeweiligen Peptidsequenz markiert ist: das Peptid GEPNV**p**SYICSR zeigt als Regulationsfaktor mit der höchsten Wahrscheinlichkeit den Wert 1.3, dasselbe Peptid mit einer Tyrosin-Phosphorylierung (GEPNV**S**pYICSR) hat einen maximal wahrscheinlichen Regulationswert von 1.2. Für das Peptid der Sequenz TS**p**SFAEPGGGGGGGGGGPGGSASGPGGTGGGK wurde ein wahrscheinlichster Faktor von 4.1 bestimmt. Die manuelle Regulationsanalyse der beiden zuletzt genannten Peptide korreliert eindeutig mit den von iTRAQassist kalkulierten Regulationsfaktoren (Abb. III.19 und III.20).

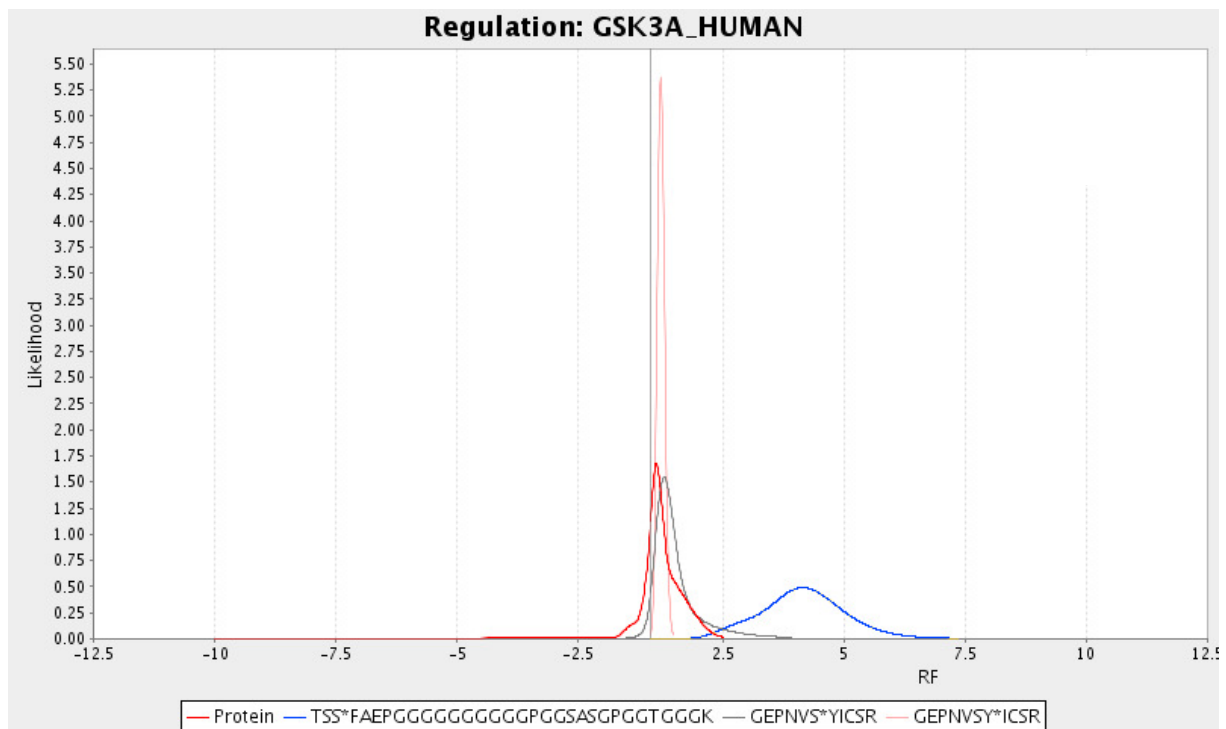


Abb. III.22: Graphische Darstellung der iTRAQassist-basierten Regulationsanalyse der Kinase GSK3A nach vierminütiger InIB_{321} -Stimulation. Die Kurvenmaxima geben den wahrscheinlichsten Regulationswert (X-Achse) und dessen Wahrscheinlichkeitswert (Y-Achse) wieder. Die rote Kurve (Protein) wurde aus allen Regulationswerten nicht-phosphorylierter GSK3A-Peptide ermittelt. Die blau-, grau- und rosafarbenen Kurven zeigen die maximal wahrscheinlichsten Regulationsfaktoren dreier phosphorylierter GSK3A-Peptide an. Während das Protein und zwei der phosphorylierten Peptide nicht reguliert sind, ist das phosphorylierte Peptid mit dem Sequenz-Ausschnitt [TS^pSF] um den Faktor vier hochreguliert bezogen auf die Kontroll-Probe (Die Aminosäure links des Sterns trägt die Phosphorylierung).

Ein phosphoryliertes Peptid wurde als reguliert betrachtet, wenn der kalkulierte Faktor größer als 1.8 bzw. kleiner als 0.6 war und nicht signifikant mit der Likelihood-Kurve der Proteinregulation überlappte. Konnte ein phosphoryliertes Peptid in mehreren Experimenten detektiert werden, musste zudem in allen Experimenten die Regulationsrichtung konsistent sein.

B. InIB_{321} induziert differentielle Phosphorylierungen an humanen Kinasen

Zur Charakterisierung regulierter Phosphorylierungen an Kinasen im c-Met-Signalweg nach InIB_{321} -Stimulation wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. In diesen Experimenten wurden 55, 120 bzw. 48 Phosphorylierungsstellen identifiziert, wobei im Durchschnitt je 80% zu Kinasen zugeordnet werden konnten (Tab. III.6).

Tab. III.6: Anzahl der identifizierten Phosphorylierungs-Stellen nach InIB₃₂₁-Stimulation.

Experiment	Phosphorylierungs-Stellen		
	Insgesamt	zu Kinasen zugeordnet	[%]
1	55	44	80
2	120	90	75
3	48	41	85

Die systematische quantitative Analyse von 106 Kinasen und 340 Proteinen ohne Kinase-Aktivität ergab letztlich, dass insgesamt elf Proteine nach vierminütiger Stimulation von HeLa S3-Zellen mit 10nM InIB₃₂₁ differentiell phosphoryliert sind. Acht phosphorylierte Peptide konnten zu Kinasen und drei phosphorylierte Peptide zu Proteinen ohne Kinase-Aktivität zugeordnet werden. Zu den stärksten Regulationen zählten dabei phosphorylierte Peptide der MAP-Kinasen Erk1 (MK03) und Erk2 (MK01). Beide Kinasen besitzen das gleiche Phosphorylierungs-Motif [TEY] in ihrer Kinase-Domäne. Die Aktivierung der Erk-Kinasen erfolgt nach Stimulation eines Wachstumsfaktor-Rezeptors wie c-Met durch die Mek-Kinasen in der Raf-MAP-Kinase-Kaskade (Raman et al., 2007). Dual-spezifische Mek-Kinasen phosphorylieren die Kinasen Erk1/2 am Threonin und Tyrosin im [TEY]-Motif in der Aktivierungsschleife der Kinase-Domäne und aktivieren somit deren Kinase-Aktivität. In Abb. III.18 wurde bereits in Westernblot-Analysen gezeigt, dass InIB₃₂₁ in der Lage ist, die Aktivierung der Erk1/2-Kinasen zu induzieren. Dabei erschien das Phosphorylierungs-Signal der Kinase Erk2 stärker als das der Kinase Erk1. Die massenspektrometrische Quantifizierung der beiden tryptischen Peptide aus der Aktivierungsschleife der Erk1- und Erk2-Kinase-Domänen korreliert mit der Beobachtung aus den Westernblot-Analysen (Abb. III.23A). Beide phosphorylierten Peptide erschienen stark reguliert (Erk2/MK01: VADPDHDHTGFL **pT**¹⁸⁴**pY**¹⁸⁶VATR, Faktor 19; Erk1/MK03: IADPEHDHTGFL **pT**²⁰¹**pY**²⁰³VATR, Faktor 8.5) wohingegen die Quantifizierung aller nicht-phosphorylierten Erk1- und Erk2-Peptide ergab, dass die Proteine selbst nicht reguliert waren.

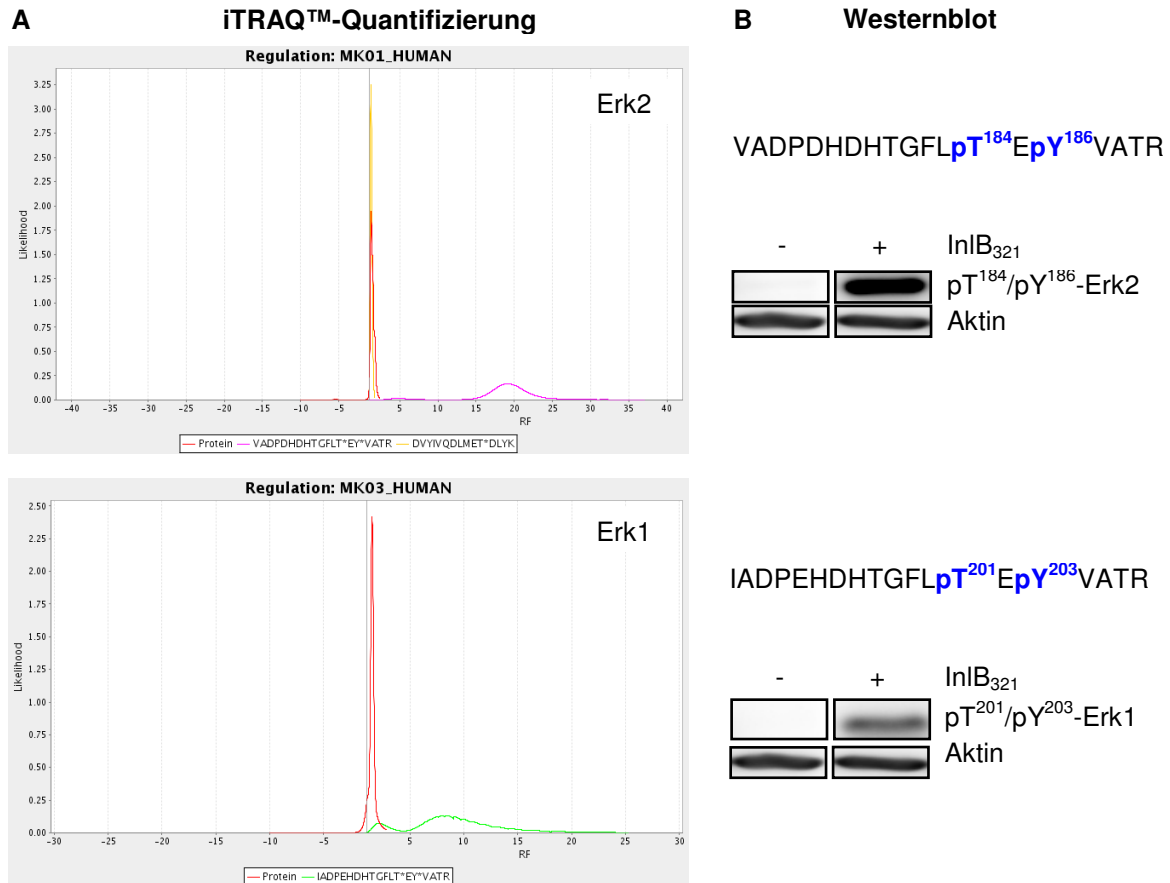


Abb. III.23: Massenspektrometrische Quantifizierung der Phosphorylierung im Bereich der Kinase-Domäne von Erk2 (MK01) und Erk1 (MK03) nach vierminütiger InIB₃₂₁-Präsentation. (A) Die mit der Kinase-Aktivierung korrelierenden phosphorylierten Peptide VADPDHDTGFLT^{pT¹⁸⁴}E^{pY¹⁸⁶}VATR (Erk2) und IADPEHDHTGFLT^{pT²⁰¹}E^{pY²⁰³}VATR (Erk1) wurden über die iTRAQ™-Reporter quantifiziert. In beiden Kinasen wurde durch InIB₃₂₁-Stimulation eine Hochregulation der Phosphorylierungen induziert (19fach in Erk2 und 8.5fach in Erk1 bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle). Die Regulationswerte der Proteinkurven hatten in beiden Kinasen ein Maximum bei 1.2 und zeigten somit keine Regulation der Proteine an. Ein zweites identifiziertes und quantifiziertes phosphoryliertes Peptid von Erk2 (DVYIVQDLME^{pT¹⁰⁹}DLYK) war ebenfalls nicht reguliert (Aminosäure links neben dem Stern trägt die Phosphorylierung). (B) Mit einem spezifischen Antikörper, der die Phosphorylierung der massenspektrometrisch quantifizierten Peptide von Erk2 und Erk1 erkennt, wurde das Ergebnis aus (A) bestätigt. Qualitativ erschien das Signal der Phosphorylierung von pT¹⁸⁴/pY¹⁸⁶-Erk2 stärker als das von pT²⁰¹/pY²⁰³-Erk1, was mit dem Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse übereinstimmt.

Neben der bereits gezeigten InIB₃₂₁-stimulierten Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade konnten von den Kinasen GSK3A und GSK3B, die als Effektoren im PI3K/Akt1(PKB)-Signalweg beschrieben sind, differentiell regulierte phosphorylierte Peptide identifiziert werden. Abb. III.24A zeigt die Ergebnisse der iTRAQassist-Regulationsanalyse. Von der Kinase GSK3A wurden drei, von der Kinase GSK3B sechs Phosphorylierungs-Stellen identifiziert. Als reguliert erschienen nur die auf die Kinase-Aktivität inhibitorisch wirkenden phosphorylierten Serine S²¹ von GSK3A (Faktor 4) und S⁹ von GSK3B (Faktor 3). Die Regulationswerte der Proteinkurven

lagen bei einem Wert von 1.1 (GSK3A) und 1.2 (GSK3B). Die in Abb. III.24A gezeigten detektierten Regulationen konnten durch Westernblot-Analysen mit pS²¹-GSK3A- und pS⁹-GSK3B-spezifischen Antikörpern bestätigt werden (Abb. III.24B).

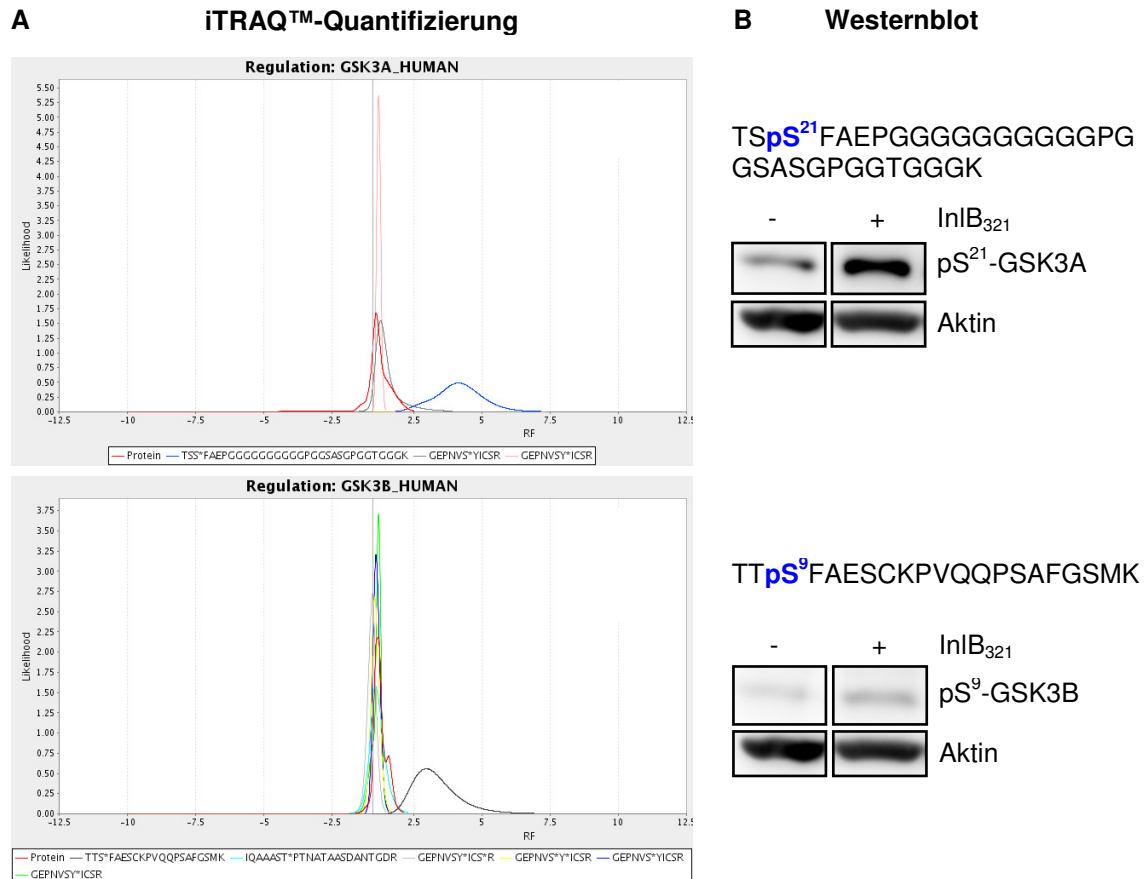


Abb. III.24: Massenspektrometrische Quantifizierung der Phosphorylierung an Serin S²¹ bzw. S⁹ der Kinasen GSK3A und GSK3B nach vierminütiger Stimulation der Zellen mit InlB₃₂₁. (A) Die mit der Inhibierung der GSK3-Kinasen korrelierenden phosphorylierten Peptide TSP^{S²¹}FAEPGGGGG GGGGGPGGGSASGPGGTGGGK (GSK3A) und TTP^{S⁹}FAESCKPVQQPSAFGSMK (GSK3B) wurden über die iTRAQTM-Reporter quantifiziert. In beiden Kinasen wurde durch InlB₃₂₁-Stimulation eine Hochregulation der Phosphorylierungen induziert (4fach in GSK3A und 3fach in GSK3B bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle). Die Regulationswerte der Proteinkurven haben in beiden Kinasen ihr Maximum bei 1.1 (GSK3A) und 1.2 (GSK3B) und sind somit nicht reguliert. Weitere identifizierte und quantifizierte phosphorylierte Peptide von GSK3A und GSK3B sind ebenfalls nicht reguliert (Aminosäure links neben dem Stern trägt die Phosphorylierung). (B) Mit einem spezifischen Antikörper, der die regulierte Phosphorylierung der massenspektrometrisch quantifizierten Peptide von GSK3A und GSK3B erkennt, konnte das Ergebnis aus (A) bestätigt werden. Qualitativ ist das Signal der Phosphorylierung von pS²¹-GSK3A stärker als das von pS⁹-GSK3B, was mit dem Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse übereinstimmt.

Positiv korrelierend zur iTRAQassist-Kalkulation erschien im Westernblot das Signal der Phosphorylierung von GSK3A-S²¹ nach InlB₃₂₁-Stimulation stärker als das von GSK3B-S⁹.

Weitere als reguliert identifizierte phosphorylierte Peptide sind in Abb. III.25 dargestellt. Von der Kinase Mek2 (MP2K2), die die Erk-Kinasen im MAP-Kinase-Signalweg aktivieren kann, wurde nur das gezeigte phosphorylierte Peptid identifiziert, weshalb in Abb. III.25A keine Wahrscheinlichkeitskurve einer Proteinregulation zu sehen ist. Das Peptid präsentiert die mit einem Faktor von 6 deutlich regulierte Phosphorylierung am Threonin T³⁹⁶, welches am C-Terminus der Kinase-Domäne lokalisiert ist.

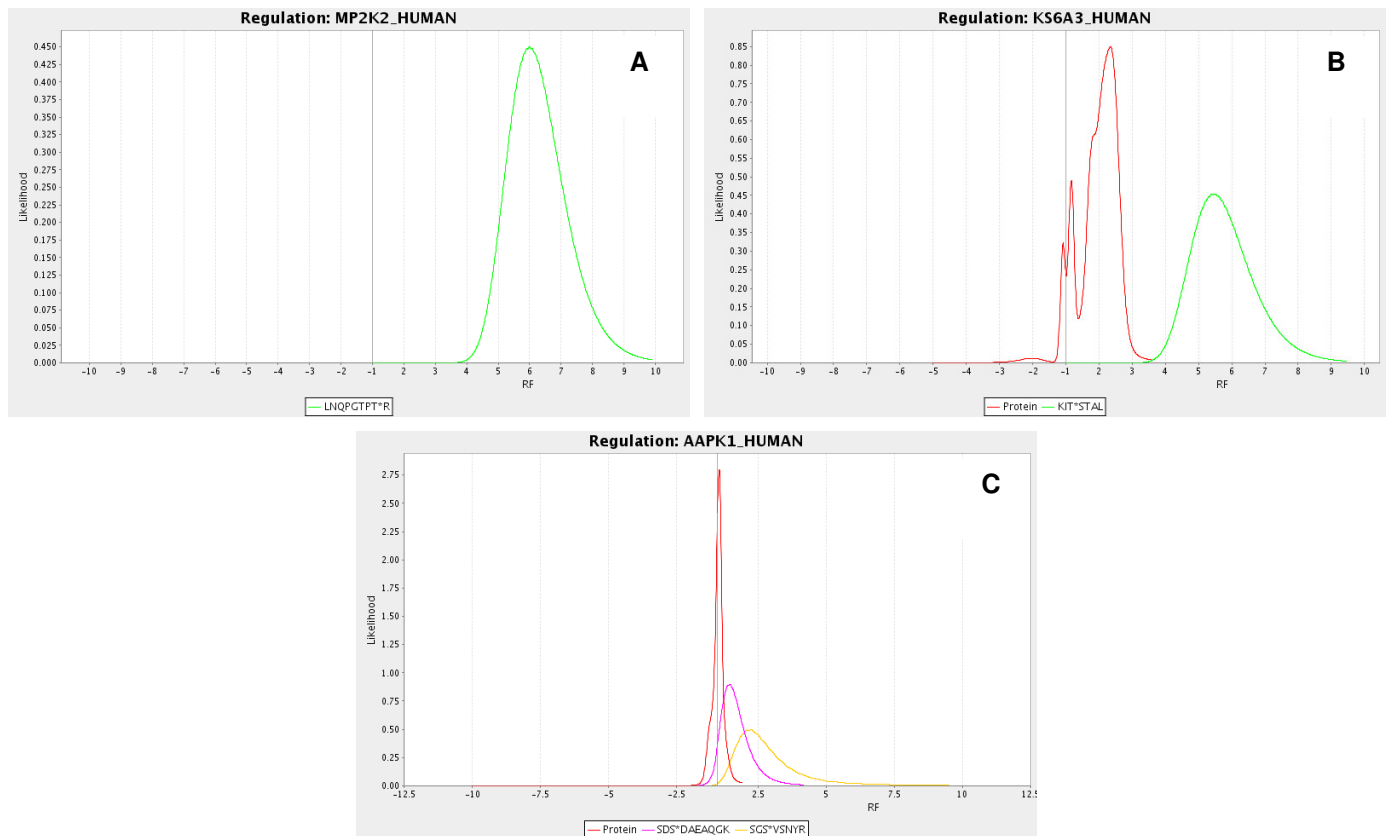


Abb. III.25: Regulierte Phosphorylierungs-Stellen an Kinasen nach InIB₃₂₁-Stimulation. (A) Von der Kinase MP2K2 (Mek2) wurde nur das phosphorylierte Peptid LNQPQTPT³⁹⁶R detektiert, dass nach Normierung über alle gemessenen Peptide mit einem Faktor von 6 reguliert war. (B) Das phosphorylierte Peptid KIP⁷³⁶STAL der Kinase KS6A3 (RSK-2) wurde mit einem Faktor von 5.5 reguliert identifiziert. Die Regulationskurve des Proteins besitzt zwei Maxima bei 1.2 und 2.3, wobei der Faktor 2.3 die höhere Wahrscheinlichkeit zeigt. (C) Von der Kinase AAPK1 (AMPK α -1) wurden zwei phosphorylierte Peptide identifiziert und quantifiziert. Das Peptid SG⁴⁸⁷VSNIYR besaß nach vierminütiger InIB₃₂₁-Stimulation einen Regulationswert von 2.2. Das zweite phosphorylierte Peptid (SD⁴⁹⁹DAEAQGK, Faktor 1.5) und das Protein selbst (Faktor 1.1) waren nicht reguliert (Aminosäure links neben dem Stern trägt die Phosphorylierung).

Die Phosphorylierungs-Stelle Threonin T⁷³⁶ der Serin/Threonin-Kinase RSK-2 (KS6A3) im Peptid KIP⁷³⁶STAL war um den Faktor 5.5 nach InIB₃₂₁-Stimulation reguliert (Abb. III.25B). Eine manuelle Kontrolle des Rohspektrums zeigte, dass die von Mascot zum Threonin T⁷³⁶ zugeordnete Modifikation ebenso am benachbarten

Serin S⁷³⁷ lokalisiert sein könnte. Die Regulationskurve des Proteins besitzt zwei Maxima mit den Faktoren 1.2 und 2.3. Die Einzel-Regulationsfaktoren der nicht-phosphorylierten Peptide von RSK-2 deuten somit auf das Vorhandensein zweier

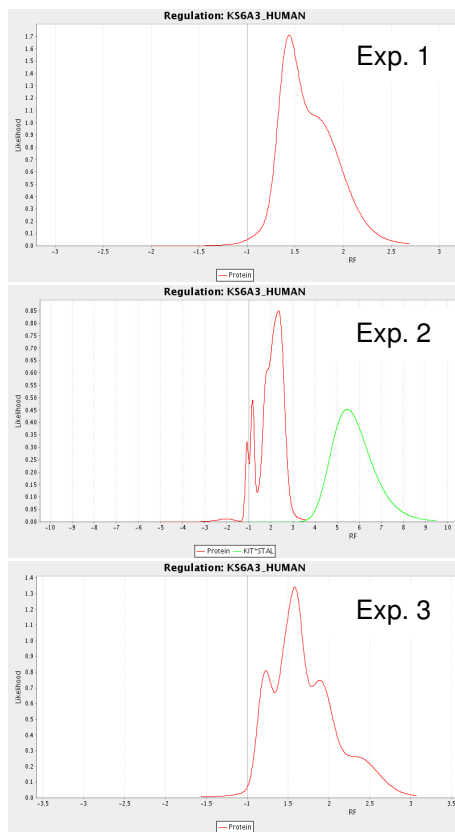


Abb. III.26: Die Regulationskurven der Kinase RSK-2 (KS6A3) nach vierminütiger InIB₃₂₁-Aktivierung von HeLa S3-Zellen. In jedem der drei durchgeführten Experimente zeigten die Kurven mehrere Maxima und Kurvenschultern, die zu höheren Regulationswerten hin tendieren. Eine mögliche Erklärung ist eine geänderte dreidimensionale Struktur nach InIB₃₂₁-Stimulation, die die Affinität der Kinase zu V16743 erhöht (Exp.: Experiment).

unterschiedlich regulierter Proteinspezies von RSK-2 nach vierminütiger Stimulation hin. Während das Peptid Klp(T⁷³⁶S⁷³⁷)STAL nur in einem der drei Experimente identifiziert werden konnte, wurden nicht-phosphorylierte Peptide der Kinase in jedem Experiment detektiert. Die Regulationskurven zeigten in jedem Experiment mehrere Maxima mit einer tendenziellen Verschiebung zum Regulationsfaktor 2 nach InIB₃₂₁-Stimulation (Abb. III.26). Eine positive Regulation kann u. a. auf Basis einer Affinitäts-Änderung zu V16743 oder auf Proteinbiosynthese beruhen, wobei zuletzt genannter Grund nach vierminütiger Perturbation nicht in Frage kommt. Somit kann aus der beobachteten Regulation der Kinase RSK-2 (KS6A3) auf eine InIB₃₂₁-abhängige strukturelle Änderung mit gesteigerter Affinität zu V16743 geschlossen werden. Von der katalytischen Untereinheit der Serin/Threonin-Kinase AMPKα-1 (AAPK1) wurden zwei phosphorylierte Peptide identifiziert (Abb. III.25C). Das C-terminal gelegene Serin S⁴⁸⁷ im Peptid SGpS⁴⁸⁷VSNYR von AMPKα-1 wurde mit einem Regulationsfaktor von 2.3 gemessen. Das Peptid SDpS⁴⁹⁹DAEAQGK und das Protein selbst waren nicht reguliert.

In einem Vergleich der drei durchgeführten Experimente wurden die phosphorylierten regulierten Peptide der Kinasen Erk1 (MK03), Erk2 (MK01) und GSK3A in zwei von drei Experimenten, die der Kinasen GSK3B, Mek2 (MP2K2), RSK-2 (KS6A3) und AMPKα-1 (AAPK1) in einem von drei Experimenten nachgewiesen (Tab .III.7). In drei von drei Experimenten wurde die Phosphorylierung am Threonin T³³³ der Serin/Threonin-Kinase Nek9 mit Regulationswerten von 3.8, 5.9 und 10.1 detektiert (Tab III.7 und Abb. III.27). Die Kurve der Nek9-Proteinregulation besaß in zwei Experimenten Maxima bei einem Faktor von 1.3 und 0.9 und im dritten Experiment

ein Maximum von 0.6. Die Kinase Nek9 ist in die Kontrolle des Mitose-Zyklus involviert und gehört zur Familie der NIMA (Never in Mitosis A)-verwandten Proteinkinasen (O'Connell et al., 2003). Threonin T³³³ von Nek9 befindet sich C-terminal der Kinase-Domäne.

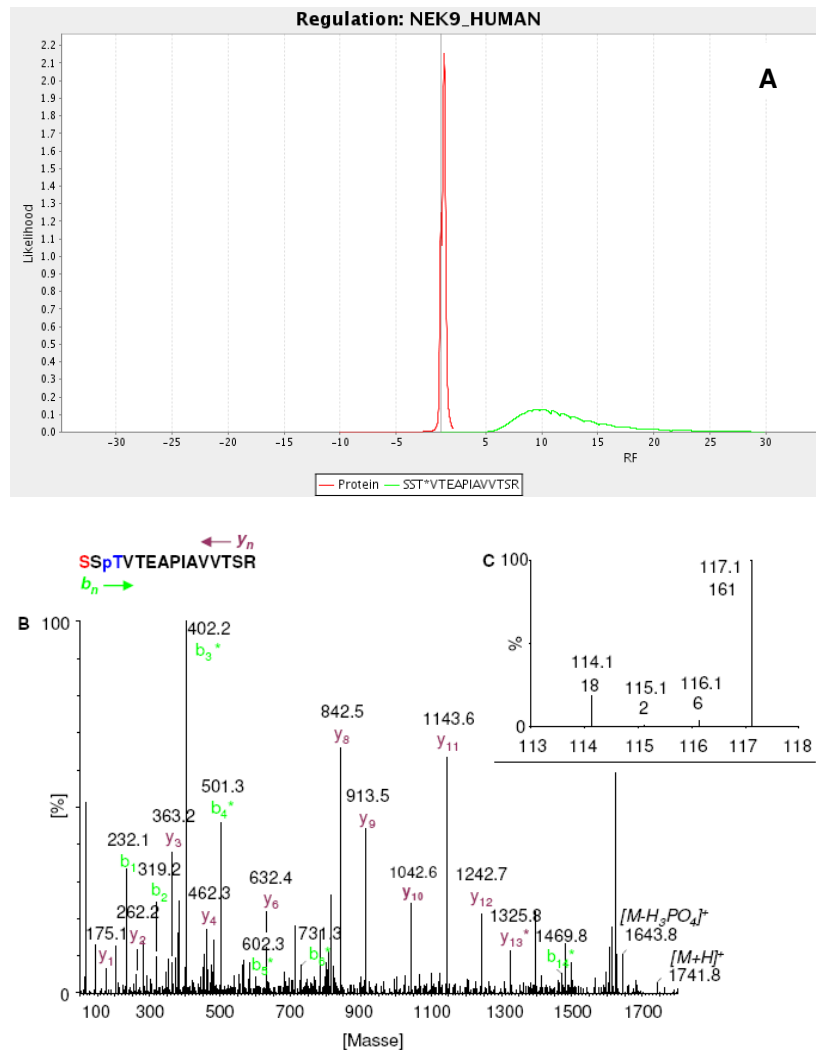


Abb. III.27: InIB₃₂₁ induziert die Phosphorylierung des Threonins T³³³ der Kinase Nek9. (A) Der iTRAQ-assist-kalkulierte Regulationsfaktor für das phosphorylierte Peptid SSPT³³³VTEAPIAVTSTR beträgt mit einer maximalen Wahrscheinlichkeit 10.1. Das Protein besitzt einen maximal wahrscheinlichen Regulationswert von 1.3 (Aminosäure links neben dem Stern trägt die Phosphorylierung). (B) Rohspektrum des Nek9-Peptides SSPT³³³VTEAPIAVTSTR. Das rot markierte N-terminale Serin trägt das jeweilige iTRAQTM-Reagenz. Die mit einem Stern markierten Fragmentationen der b- und y-Serien ermöglichten die Zuordnung der Phosphorylierungs-Stelle zu Threonin T³³³. (C) Vergrößerter Ausschnitt des Rohspektrums mit den Fragmentationen der iTRAQTM-Reporter aus (B). Das intensivste Ion mit der Masse 117Da ist der Reporter der InIB₃₂₁-stimulierten Probe (Kontrolle 114Da).

In Tab. III.7. sind sämtliche Regulationsfaktoren, Protein- und Peptid-Scores der Mascot-Suchergebnisse der regulierten phosphorylierten Kinasepeptide über alle drei InIB₃₂₁-stimulierten quantitativen Phosphokinom-Experimente zusammengefasst.

Tab. III.7: Phosphorylierte Peptide von Kinasen, die nach InIB₃₂₁-Stimulation als reguliert detektiert wurden.

Protein							Phosphoryliertes Peptid									
Protein Name ^a	Protein Score ^b			Regulationsfaktor ^c			Peptid-Sequenz	pSTY	Peptid Score ^b			Regulationsfaktor ^c			Experiment	
	1	2	3	1	2	3			1	2	3	1	2	3		
Nek9	607	908	622	1.3	0.6	0.9	SSpTVTEAPIAVVTSR	T ³³³	28	82	72	10.1	5.9	3.8		
MK01	276	848	297	0.9	1.2	1.7	VADPDHDTGFLpTEpYVATR	T ¹⁸⁴ Y ¹⁸⁶	n.d.	59	51	n.d.	19.1	30.4		
MK03	118	290	180	0.9	1.4	1.2	IADPEHDTGFLpTEpYVATR	T ²⁰¹ Y ²⁰³	n.d.	61	56	n.d.	14.9	8.5		
GSK3A	352	600	652	0.8	1.1	1.1	TSpSFAEPGGGGGGGGGGPGGSASGPGGTGGGK	S ²¹	n.d.	98	119	n.d.	3.3	4.1		
GSK3B	391	812	626	1.0	1.2	1.2	TTpSFAESCKPVQQPSAFGSMK	S ⁹	n.d.	30	n.d.	n.d.	3.0	n.d.		
MP2K2	41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	LNQPGTPpTR	T ³⁹⁶	41	n.d.	n.d.	6.0	n.d.	n.d.		
KS6A3	335	703	308	1.6	2.3	1.4	KIpTSTAL	(T ⁷³⁶ S ⁷³⁷)	n.d.	25	n.d.	n.d.	5.5	n.d.		
AAPK1	334	332	150	1.1	1.1	1.1	SGpSVSNYR	S ⁴⁵⁷	43	n.d.	n.d.	2.2	n.d.	n.d.		

a: UniprotKB/Swiss-Prot 51.0; b: Mascot-Ergebnis; c: iTRAQassist-Regulationsfaktoren; n.d.: nicht detektiert

Von Proteinen ohne Kinase-Aktivität konnten drei regulierte Phosphorylierungs-Stellen identifiziert werden, wobei jede in einem von drei Experimenten detektiert wurde (Tab. III.8). In der ATP-Citrat Synthase ACLY war das Serin S⁴⁵⁵ um den Faktor 2.5 reguliert. Im CDK5 und ABL1 Enzym Substrat1 (CABL1) konnte das in der CDK3-Interaktionsdomäne liegende Threonin T⁴¹⁵ mit einem Regulationsfaktor von 2.0 identifiziert werden. Das uncharakterisierte Protein KIAA0528 (K0528) wurde mit einem Wert von 2.5 differentiell am Serin S⁶⁵⁹ phosphoryliert.

Tab. III.8: Phosphorylierte Peptide von Proteinen ohne Kinase-Aktivität, die nach InIB₃₂₁-Stimulation als reguliert detektiert wurden.

Protein							Phosphoryliertes Peptid									
Protein Name ^a	Protein Score ^b			Regulationsfaktor ^c			Peptid-Sequenz	pSTY	Peptid Score ^b			Regulationsfaktor ^c			Experiment	
	1	2	3	1	2	3			1	2	3	1	2	3		
ACLY	400	618	78	1.0	0.9	1.3	TApSFSESER	S ⁴⁵⁵	35	n.d.	n.d.	2.5	n.d.	n.d.		
CABL1	75	413	152	1.0	0.7	0.9	RNPIDSTSSFSQFR	T ⁴¹⁵	n.d.	62	n.d.	n.d.	2.0	n.d.		
K0528	170	580	157	0.9	0.7	1.0	SQpSESSDEVTELDLSHGK	S ⁶⁵⁹	n.d.	n.d.	65	n.d.	n.d.	2.5		

a: UniprotKB/Swiss-Prot 51.0; b: Mascot-Ergebnis; c: iTRAQassist-Regulationsfaktoren; n.d.: nicht detektiert

In einem die vier Datenbanken Uniprot/Swiss-Prot, Phosphosite, Phospho.ELM und PhoSida umfassenden Vergleich wurde überprüft, welche der detektierten regulierten Phosphorylierungs-Stellen durch einen Eintrag bereits bekannt sind oder bislang noch nicht identifiziert wurden. Eine der insgesamt elf InIB₃₂₁-abhängig regulierten Phosphorylierungen wurde erstmals in dieser Arbeit erfasst und ist bislang noch nicht in einem Datenbank-Eintrag abgelegt (Tab. III.9).

Tab. III.9: Datenbank-Einträge der nach InIB₃₂₁-Stimulation regulierten phosphorylierten Peptide von Kinasen und Proteinen ohne Kinase-Aktivität.

Protein Name ^a	pSTY	bekannt	Datenbank Eintrag			
			UniProt/Swiss-Prot ^a	Phosphosite	Phospho.ELM 6.0	Phosida
Nek9	T ³³³	j	j	n	n	n
MK01	T ¹⁸⁴ Y ¹⁸⁶	j/j	j/j	j/j	j/j	j/j
MK03	T ²⁰¹ Y ²⁰³	j/j	j/j	j/j	j/j	j/j
GSK3A	S ²¹	j	j	j	j	n
GSK3B	S ⁹	j	j	j	j	n
MP2K2	T ³⁹⁶	j	j	j	j	j
KS6A3	(T ⁷³⁶ S ⁷³⁷)	j (S ⁷³⁷)	j (S ⁷³⁷)	n	n	n
AAPK1	S ⁴⁸⁷	j	n	j	j	n
ACLY	S ⁴⁵⁵	j	j	j	j	j
CABL1	T⁴¹⁵	n	n	n	n	n
K0528	S ⁶⁵⁹	j	j	n	j	n

a: UniprotKB/Swiss-Prot 51.0; j: Eintrag in der jeweiligen Datenbank vorhanden, n: nicht vorhanden

C. Die InIB-Variante InIB₃₂₁/StreptIIc LoF kann die c-Met-Signalkaskade nicht aktivieren

Die bisher gezeigten Ergebnisse wurden durch Stimulation von HeLa S3-Zellen mit InIB₃₂₁ im Vergleich zu nicht-behandelten Zellen erarbeitet. In einem weiteren Experiment nach Abb. III.1 wurden die Kontroll-Zellen mit einer InIB₃₂₁-Variante behandelt, die nicht mehr in der Lage ist, c-Met zu binden und zu aktivieren. Der Verlust der Bindung zu c-Met beruht auf dem Austausch von fünf aromatischen Aminosäuren (F104S, W124S, F126S, Y170S, Y214S) in den Leucin-reichen Sequenzen von InIB₃₂₁ (Machner et al., 2003). Die rekombinante Expression des funktionslosen InIB₃₂₁-Derivates (InIB₃₂₁/StreptIIc LoF) und des nativen InIB₃₂₁ (InIB₃₂₁/StreptIIc WT) wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit betreut und von Stefan Muschal (Muschal, 2006) im pASK-IBA-Vektor-System (IBA GmbH, Göttingen) in *E.coli* BL21 durchgeführt. Die beiden Proteine besitzen am C-Terminus einen acht Aminosäure umfassenden StrepTag II (Schmidt et al., 1996), der zur Aufreinigung verwendet wurde. Durch den StrepTag II und zwei zusätzliche Linker-Aminosäuren zwischen dem Tag und dem C-Terminus von InIB₃₂₁ erhöht sich das Molekulargewicht des InIB₃₂₁/StreptIIc WT auf 33145Da, das des InIB₃₂₁/StreptIIc LoF-Derivates auf 32789Da (Abb. III.28). Die in der SDS-PAGE in jedem der beiden rekombinanten Konstrukte auftretenden Doppelbanden (Abb. III.28B) wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und durch N-terminale Sequenzierung charakterisiert. Die Proteine der oberen beiden Banden zeigten N-terminal keinerlei Abweichungen von der erwarteten Aminosäuresequenz. Den Proteinen der unteren Banden fehlten jeweils die vier N-terminalen Aminosäuren. Bei der fünften N-terminalen Aminosäure in InIB₃₂₁ handelt es sich um Valin, dessen Triplett gtg von *E.coli* ebenfalls als Startcodon verwendet werden kann. Zusätzlich hat sich durch

eine abschließende DNA-Sequenzierung der in das pASK-IBA-Vektor eingebrachten InlB₃₂₁ WT- und InlB₃₂₁ LoF-Sequenzen gezeigt, dass In der LoF-Variante zwei weitere Mutationen (I44T und A227V) entstanden sind. Der Verlust der ersten fünf Aminosäuren in beiden sowie der Aminosäure-Austausch I44T in InlB₃₂₁/StrepIIc LoF betrifft nur die N-terminale Cap-Domäne, die nicht in die Bindung zu c-Met involviert ist. Der Einfluss der Mutation A227V auf die Bindung zu c-Met wurde von Dr. H. Niemann (Abteilung Strukturbioogie, Prof. Dr. D. Heinz, HZI) im Modell überprüft. Eine direkte Interaktion von A227 zu c-Met konnte nicht festgestellt werden.

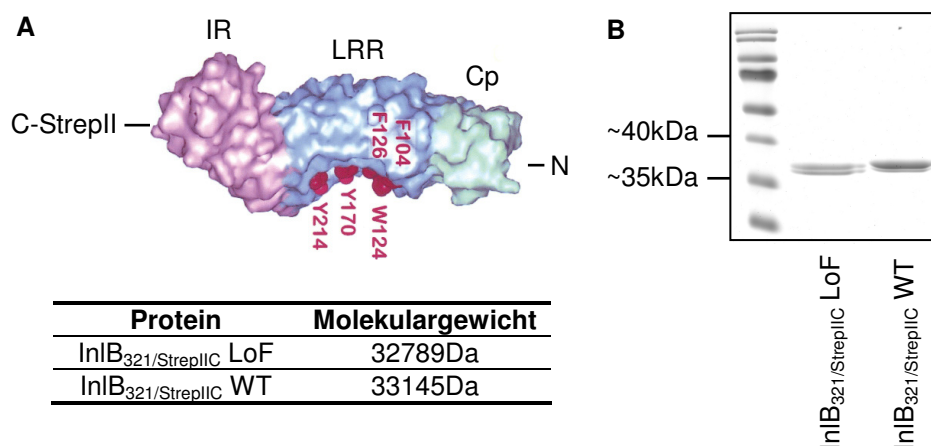


Abb. III.28: C-terminal mit einem StrepTagII fusionierte rekombinant hergestellte InlB₃₂₁-Konstrukte. (A) Die fünf aromatischen Aminosäuren in den LRR-Sequenzen sind essentiell für die Bindung zu c-Met. In der funktionslosen InlB₃₂₁-Variante InlB₃₂₁/StrepIIc LoF (Loss of Function) wurden die markierten Aminosäuren gegen Serine ersetzt. In der LoF-Variante verringert sich dadurch das Molekulargewicht auf 32789Da im Vergleich zu InlB₃₂₁/StrepIIc WT (Wildtype). (B) Die beiden Affinitäts-gereinigten Konstrukte zeigen in der Coomassie-gefärbten SDS-PAGE eng beieinander liegende Banden. Höhermolekulare Verunreinigungen oder niedermolekulare Abbauprodukte sind nicht zu erkennen (Struktur: Machner et al., 2003, IR: Interrepeat, LRR: Leucin-reiche Sequenzen, Cp: Cap).

Zunächst wurde der durch Austausch der fünf aromatischen Aminosäuren in InlB₃₂₁/StrepIIc LoF erwartete Verlust der c-Met-Aktivierung in HeLa S3-Zellen überprüft. Hierfür wurden in Serum-freiem Medium konditionierte semikonfluente Zellen mit jeweils 10nM InlB₃₂₁/StrepIIc WT, InlB₃₂₁/StrepIIc LoF oder mit dem bereits charakterisierten InlB₃₂₁ (Abb. III.18) für vier Minuten stimuliert, lysiert und die Proteine der Gesamt-Zelllysate in einem PA-Gel aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran wurde die Aktivierung von c-Met, Erk1/2 und Akt1(PKB) mit spezifischen Antikörpern gegen mit der Aktivität korrelierenden Phosphorylierungs-Stellen in den jeweiligen Proteinen detektiert (Abb. III.29). Wie bereits durch Stimulation mit InlB₃₂₁ gezeigt (Abb. III.18) induziert InlB₃₂₁/StrepIIc WT ebenfalls die Phosphorylierung der Tyrosine Y¹²³⁴ und Y¹²³⁵ in der c-Met-Kinase-Domäne, die

Phosphorylierung der [TEY]-Motife der MAP-Kinasen Erk1 (T²⁰¹EY²⁰³) und Erk2 (T¹⁸⁴EY¹⁸⁶) und die Phosphorylierung des C-terminalen Serin S⁴⁷³ der Kinase Akt1(PKB). Der Austausch der fünf aromatischen Aminosäuren in den Leucin-reichen Sequenzen gegen Serine verhindert dagegen die c-Met-Autophosphorylierung und die Induktion der c-Met-Signalkaskade vollständig.

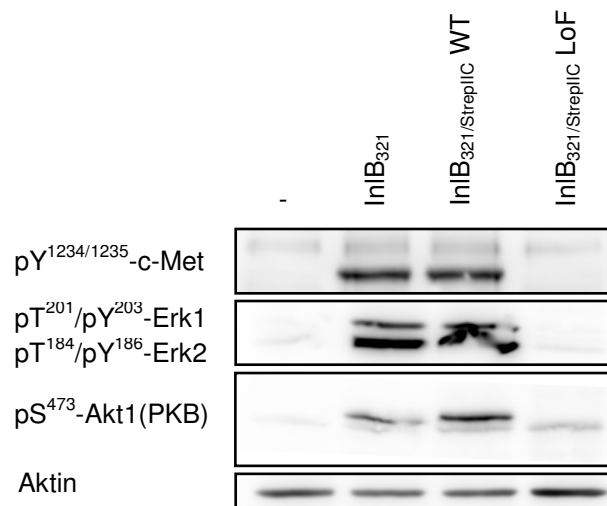


Abb. III.29: Der Austausch der fünf aromatischen Aminosäuren in den Leucin-reichen Sequenzen von InlB₃₂₁ verhindert die Aktivierung der c-Met-Signalkaskade. In Serum-freiem Medium konditionierte HeLa S3-Zellen wurden mit je 10nM der beiden InlB₃₂₁/StrepCII-Derivate sowie mit dem bereits verwendeten InlB₃₂₁ für 4min stimuliert. Die Aktivierung von c-Met, Erk1/2 und Akt1(PKB) wurde durch Phosphorylierungs-Stellen-spezifische Antikörper überprüft.

Auf Basis der funktionellen Westernblot-Studien des InlB₃₂₁/StrepIIIC LoF/InlB₃₂₁/StrepIIIC WT-Liganden-Systems wurde ein Experiment zur quantitativen Charakterisierung von Phosphorylierungen an Kinasen (Abb. III.1) nach vierminütiger Stimulation durchgeführt. Der InlB₃₂₁/StrepIIIC LoF-Liganden-Ansatz wurde dabei als Regulationsbasis verwendet. Die Ergebnisse der Regulationsanalyse sind in Tab. III.10 dargestellt. Von in diesem Experiment insgesamt 94 identifizierten Phosphorylierungs-Stellen konnten 72 (77%) zu Kinasen zugeordnet werden. Die bereits für den InlB₃₂₁-c-Met-Signalweg als sehr ausgeprägt charakterisierten differentiellen Phosphorylierungen an MK01 (Erk2, pT¹⁸⁴/pY¹⁸⁶), MK03 (Erk1, pT²⁰¹/pY²⁰³) und GSK3A (pS²¹) konnten auch in diesem Experiment mit Faktoren von 36 (MK01), 23.5 (MK03) und 3 (GSK3A) als reguliert bestätigt werden. Ebenfalls wurde die Regulation der Phosphorylierungs-Stelle Threonin T³³³ der Serin/Threonin-Kinase Nek9 detektiert.

Tab. III.10: Phosphorylierte Peptide von Kinasen, die nach InIB₃₂₁/StreptIIc WT-Stimulation als reguliert detektiert wurden.

Protein			Phosphoryliertes Peptid			
Protein Name ^a	Protein Score ^b	Regulationsfaktor ^c	Peptid-Sequenz	pSTY	Peptid Score ^b	Regulationsfaktor ^c
Nek9	694	0.5	SS pT VTETAPIAVVTSR	T ³³³	63	2.3
MK01	821	1.0	VADPDHDHTGFL pTEp YVATR	T ¹⁸⁴ Y ¹⁸⁶	48	36
MK03	362	1.0	IADPEHDHTGFL pTEp YVATR	T ²⁰¹ Y ²⁰³	44	23.5
GSK3A	596	0.9	TS pS FAEPGGGGGGGGGGPGGSASGPGGTGGGK	S ²¹	105	3
CDKL5	212	0.6	DLTNNNIPHLL pSPK	S ⁴⁰⁷	36	2.7
RIOK2	142	1.0	AEVYG pS ENESER	S ³⁵⁰	47	0.5
MARK1	409	1.0	LD pT FCGSPPYAAPELFQGK	T ²¹⁵	41	0.6
MARK2	301	1.0	LD pT FCGSPPYAAPELFQGK	T ²⁰⁸	41	0.6
MARK3	291	1.0	LD pT FCGSPPYAAPELFQGK	T ²³⁴	41	0.6

a: UniprotKB/Swiss-Prot 51.0; b: Mascot-Ergebnis; c: iTRAQassist-Regulationsfaktoren

Zusätzlich konnten fünf weitere differentielle Phosphorylierungen an Kinasen beobachtet werden: Serin S⁴⁰⁷ der CDK-ähnlichen Serin/Threonin-Kinase CDKL5 war um einen Wert von 2.7 hochreguliert, wohingegen das Protein selbst mit einem Regulationsfaktor von 0.6 nach InIB₃₂₁/StreptIIc WT-Stimulation eine gegenläufige Regulation zeigte. Von der RIO2-Serin/Threonin-Kinase (RIOK2) wurde ein in der Kinase-Domäne liegendes Serin (S³⁵⁰) mit einem Faktor von 0.5 als reguliert detektiert. Die Peptide mit den phosphorylierten Aminosäuren Threonin T²¹⁵ von MARK1, Threonin T²⁰⁸ von MARK2 und Threonin T²³⁴ von MARK3 waren mit je einem Regulationswert von 0.6 identifiziert worden. Das Peptid mit der Sequenz LD**pT**FCGSPPYAAPELFQGK ist homolog in allen vier Kinasen der humanen MARK-Familie. Da die Kinasen MARK1/2/3 mit spezifischen Peptiden identifiziert wurden, kann die detektierte Regulation des phosphorylierten Peptides nicht speziell zu einer der MARK-Kinasen zugeordnet werden. MARK4 wurde nicht identifiziert. Die in den drei Stimulations-Experimenten mit dem Liganden InIB₃₂₁ (Tab. III.7) identifizierten regulierten Phosphorylierungs-Stellen der Kinasen GSK3B, Mek2 (MP2K2), RSK-2 (KS6A3) und AMPKα1 (AAPK1) wurden in diesem Experiment nicht detektiert.

Von Proteinen ohne Kinase-Aktivität wurden zwei phosphorylierte Peptide des Proteins CDK5 und ABL1 Enzym Substrat1 (CABL1) als reguliert identifiziert (Tab. III.11).

Tab. III.11: Phosphorylierte Peptide von CABL1, die nach InIB₃₂₁/StreptIIc WT-Stimulation als reguliert detektiert wurden.

Protein			Phosphoryliertes Peptid			
Protein Name ^a	Protein Score ^b	Regulationsfaktor ^c	Peptid-Sequenz	pSTY	Peptid Score ^b	Regulationsfaktor ^c
CABL1	340	0.7	RN pT IDSTSSFSQFR	T ⁴¹⁵	45	1.6
	340	0.7	S pS LETLEDIEENAPLRR	S ²⁹¹	23	0.3

a: UniprotKB/Swiss-Prot 51.0; b: Mascot-Ergebnis; c: iTRAQassist-Regulationsfaktoren; n.d.: nicht detektiert

Threonin T⁴¹⁵ von CABL1 war mit einem Faktor von 1.6 nur schwach reguliert. Da das Protein selbst mit einem Faktor von 0.7 negativ reguliert war, ergibt sich jedoch nach Normierung auf das Protein ein relativer Regulationsfaktor von 2.3 für das an Threonin T⁴¹⁵ phosphorylierte Peptid. Während diese Regulation bereits in den Experimenten mit InIB₃₂₁ identifiziert wurde, konnte in diesem Experiment eine weitere Phosphorylierungs-Stelle (Serin S²⁹¹) im Protein CABL1 identifiziert werden, die im Vergleich zu dem Peptid RNpT⁴¹⁵IDSTSSFSQFR negativ reguliert war (Abb. III.30).

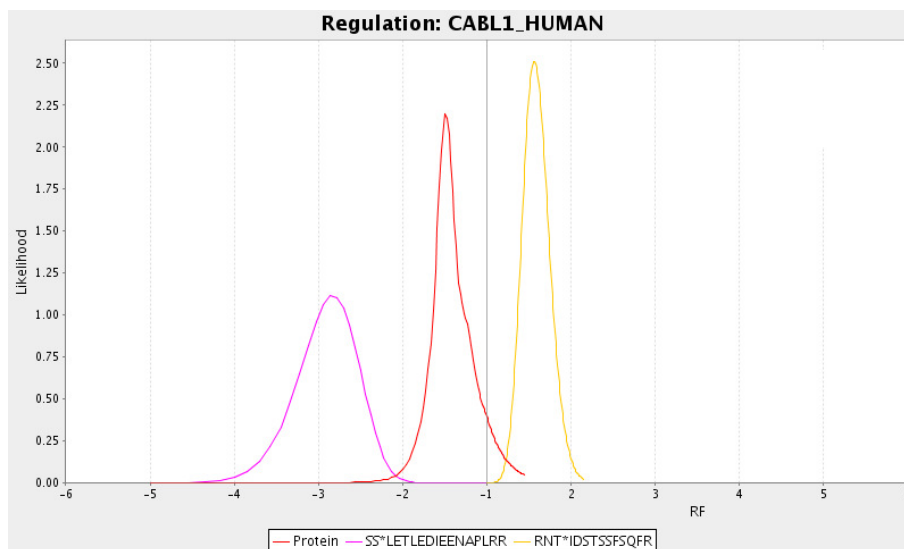


Abb. III.30: Zwei InIB₃₂₁/StrepIIIC WT-abhängig gegensätzlich regulierte phosphorylierte Peptide im Protein CDK5 und ABL1 Enzym Substrat1 (CABL1). Das am Threonin T⁴¹⁵ phosphorylierte Peptide RNpT⁴¹⁵IDSTSSFSQFR zeigte einen Regulationsfaktor von 1.6 und würde als nicht reguliert betrachtet werden. Da aber das Protein selbst um den Faktor 0.7 leicht herunterreguliert erschien, ergibt sich nach Normierung des Proteins auf den Faktor 1 für das Peptid eine Netto-Regulation von 2.3. Das phosphorylierte Peptid SpS²⁹¹LETLEDIEENAPLRR war um den Faktor 0.3 herunterreguliert. Nach Normierung ergibt sich für das pS²⁹¹-Peptid ein Nettofaktor von 0.4 (Aminosäure links neben dem Stern trägt die Phosphorylierung).

Ein Abgleich der in diesem Experiment neu identifizierten regulierten Phosphorylierungs-Stellen mit Einträgen der Datenbanken Uniprot/Swiss-Prot, Phosphosite, Phospho.ELM und PhoSida zeigte, dass S⁴⁰⁷ der Kinase CDKL5, S³⁵⁰ der Kinase RIOK2 sowie S²⁹¹ und T⁴¹⁵ des Proteins CABL1 erstmals in dieser Arbeit beschrieben wurden (Tab. III.12).

Tab. III.12: Datenbank-Einträge der nach InIB₃₂₁/StreptIIIC WT-Stimulation regulierten phosphorylierten Peptide von Kinasen und Proteinen ohne Kinase-Aktivität.

Protein Name ^a	pSTY	bekannt	Datenbank Eintrag			
			UniProt/Swiss-Prot ^a	Phosphosite	Phospho.ELM 6.0	Phosida
CDKL5	S ⁴⁰⁷	n	n	n	n	n
RIOK2	S ³⁵⁰	n	n	n	n	n
MARK1	T ²¹⁵	j	j	j	j	n
MARK2	T ²⁰⁸	j	j	j	j	n
MARK3	T ²³⁴	j	j	j	j	n
CABL1	T ⁴¹⁵	n	n	n	n	n
	S ²⁹¹	n	n	n	n	n

a: UniProtKB/Swiss-Prot 51.0; j: Eintrag in der jeweiligen Datenbank vorhanden, n: nicht vorhanden

4. Quantitative Phosphokinom-Analysen im HGF/SF-c-Met-Signalweg

Nachdem quantitative Analysen an Kinasen im InlB₃₂₁-c-Met Signalweg erfolgreich zur Identifizierung differentieller Phosphorylierungen geführt haben, stellte sich die Frage, ob nach Stimulation der c-Met-Signalkaskade mit dem physiologischen Liganden HGF/SF dieselben Ereignisse oder bislang noch nicht identifizierte Regulationen an phosphorylierten Peptiden auftreten. Aus diesem Grund wurde eine Induktion mit dem Wachstumsfaktor HGF/SF durchgeführt. HGF/SF wurde in der murinen Zelllinie NSO rekombinant exprimiert und nach Aufreinigung von Dr. Ermanno Gherardi (MRC Centre and Laboratory of Molecular Biology, Cambridge UK) zur Verfügung gestellt. HGF/SF wird als Polypeptidkette translatiert und durch proteolytische Spaltung in die ca. 80kDa schwere heterodimere aktive Form überführt (Abb. III.31A). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einer eindimensionalen SDS-PAGE getrennt, konnte nach Coomassie-Färbung eine Doppelbande zwischen ~70 und ~100kDa detektiert werden (Abb. III.31B, NR).

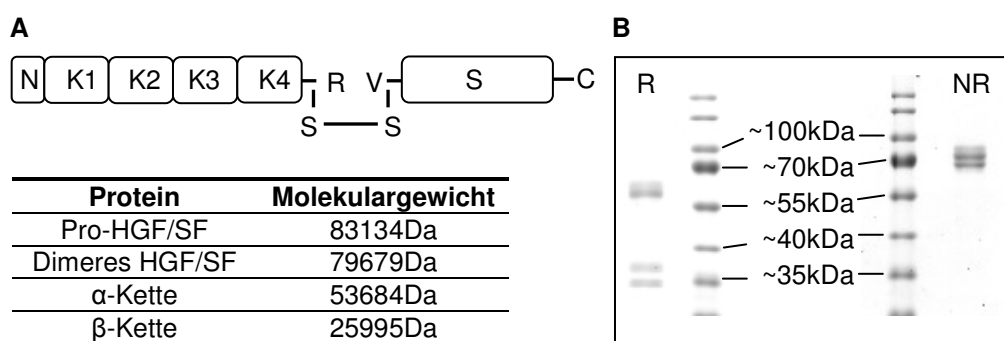


Abb. III.31: Der in der Maus-Myelom-Zelllinie NSO rekombinant exprimierte humane Wachstumsfaktor HGF/SF. (A) Domänen-Aufbau von HGF/SF und Molekulargewicht des unprozessierten HGF/SF, des heterodimeren HGF/SF und der α - und β -Kette (N: N-terminale Domäne; K: Kringel-Domänen; SP: Serinprotease-Homologie-Domäne). (B) Coomassie-gefärbte SDS-PAGE von HGF/SF. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen (NR) erscheint eine Doppelbande bei ~70kDa. Unter reduzierenden Bedingungen (R) erscheinen eine Bande oberhalb des ~55kDa-Markersignals und zwei Banden zwischen ~35 und ~40kDa (HGF/SF wurde von Dr. Ermanno Gherardi, MRC Centre and Laboratory of Molecular Biology, Cambridge UK bereitgestellt).

Um zu differenzieren, ob es sich bei der höhermolekularen Bande um die nichtprozessierte HGF/SF-Variante handelte, wurde HGF/SF unter reduzierenden Bedingungen erneut in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. III.31B, R). Zwei distinkte Signale und eine diffuse Bande konnten detektiert werden, wobei die hochmolekulare diffuse Bande zwischen dem 70kDa- und dem 55kDa-Markersignal erschien und die beiden niedermolekularen Signale bei einem Molekulargewicht unterhalb von ~40kDa und ~35kDa detektiert wurden. Da die höhermolekulare Bande unter reduzierenden Bedingungen deutlich unterhalb der 70kDa-Markerbande angefärbt

wurde, kann angenommen werden, dass diese Bande die ca. 54kDa große HGF/SF- α -Kette darstellt. Bei den beiden niedermolekularen Banden handelt es sich vermutlich um zwei Varianten der β -Kette, die sich im Glykosylierungsmuster unterscheiden.

A. HGF/SF induziert die c-Met-Signalkaskade in der humanen Cervix-Karzinom-Zelllinie HeLa S3

Aus veröffentlichten Studien geht hervor, dass HGF/SF die Autophosphorylierung von c-Met in einem weitaus effizienteren Maße stimuliert als die verkürzte InlB-Variante InlB₃₂₁ (Banerjee et al., 2004; Copp et al., 2003). Um den zeitlichen Ablauf der Aktivierung der c-Met-Signalkaskade in der Zell-Linie HeLa S3 zu charakterisieren, wurden deshalb semikonfluente Zellen nach Konditionierung in Serum-freiem Medium mit 1nM HGF/SF in einer Zeitabfolge bis acht Minuten stimuliert. Nach Lyse, Auftrennung der Proteine in einem 10%igen PA-Gel und Transfer auf eine PVDF-Membran wurde die Aktivierung von c-Met und der Komponenten Mek1/2, Erk1/2 und Akt1(PKB) durch die bereits in Kapitel III.2.B. beschriebenen spezifischen Antikörper untersucht. Die Autophosphorylierung von c-Met und die Serin S⁴⁷³-Phosphorylierung der Kinase Akt1(PKB) konnte bereits nach zweiminütiger Stimulation detektiert werden. Die Aktivierung der Kinasen Mek1/2 und Erk1/2 setzte nach vierminütiger HGF/SF-Stimulation ein (Abb. III.32A). Der zeitliche Ablauf der HGF/SF-induzierten Aktivierung der c-Met Signalkaskade ähnelte den Ergebnissen aus der InlB₃₂₁-Stimulation (Abb. III.18A). Nach Normierung auf zelluläres Aktin wurden die detektierten Signale densitometrisch quantifiziert (Abb. III.32B). Die relative Signalzunahme der Aktivierung von c-Met, Mek1/2, Erk1/2 und Akt1(PKB) unterschied sich insofern von den Ergebnissen der InlB₃₂₁-Stimulation (Abb. III.18B), dass die Phosphorylierung von c-Met und Akt1(PKB) nur einen sehr geringfügigen Anstieg zeigten, wohingegen die Aktivierung der Mek- und Erk-Kinasen relativ gesehen ähnlich stark ausfiel. Für die quantitativen Analysen an Kinasen im c-Met Signalweg wurde analog zu den InlB₃₂₁-induzierten Experimenten eine vierminütige HGF/SF-Stimulation gewählt.

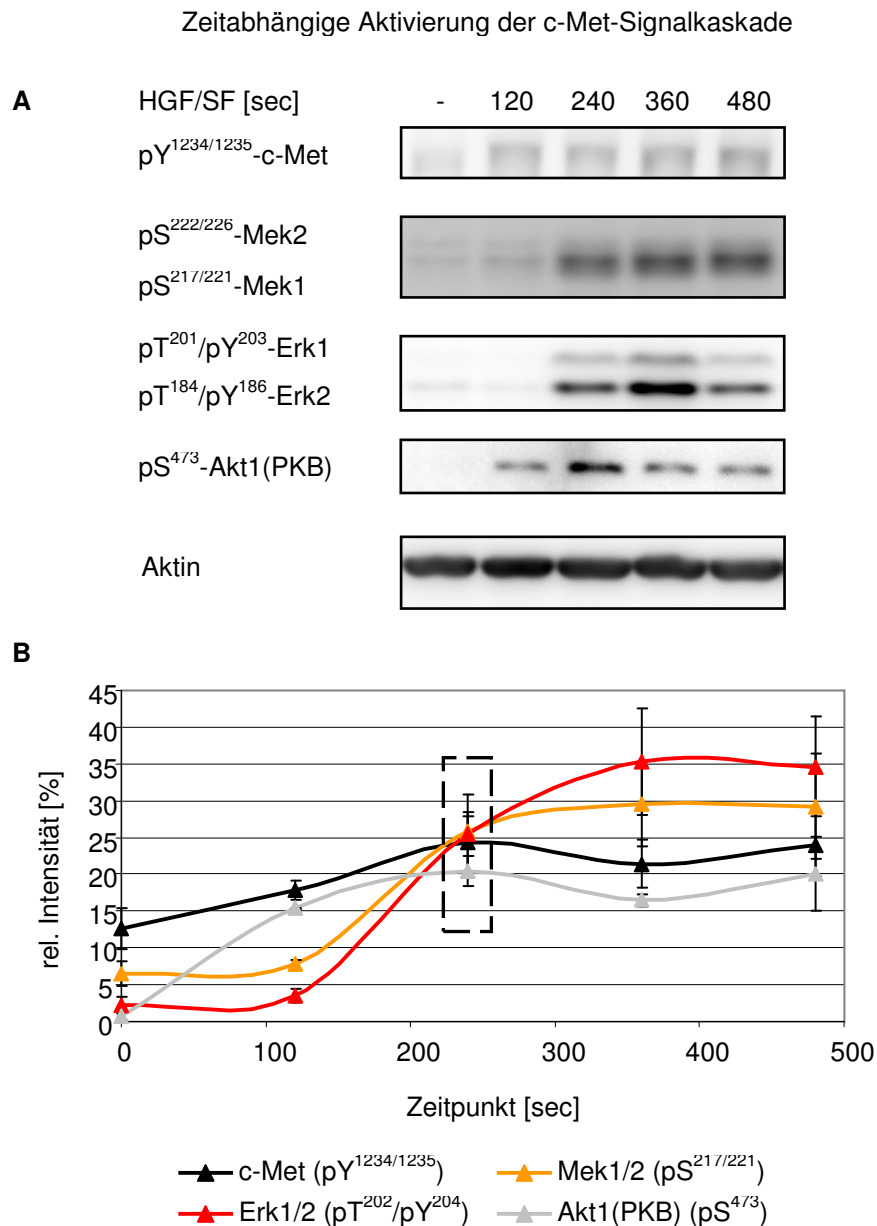


Abb. III.32: HGF/SF-Aktivierung der c-Met-Signalkaskade. (A) Zeitaufgelöste Westernblot-Analysen nach HGF/SF-Induktion (1 nM, angegebene Zeitpunkte). Bekannte Komponenten des PI3K/Akt1(PKB)- und des MAP-Kinase-Signalweges werden aktiviert. (B) Nach Normalisierung auf zelluläres Aktin wurden die Signalstärken der Phosphorylierungen densitometrisch quantifiziert. Der Anstieg der c-Met-Aktivierung in den ersten acht Minuten nach Stimulation fiel sehr gering aus, wohingegen die Erk-Kinasen den stärksten Unterschied im Anstieg der relativen Signalintensität im Induktionszeitraum zeigten. Die c-Met- und Akt1(PKB)-Aktivierung begann bereits früher, stieg allerdings nicht so stark an wie die Aktivierung der Kinasen Mek1/2 und Erk1/2. Für die quantitative Phosphokinom-Studie wurde der 4-Minuten-Zeitpunkt (gestrichelte Markierung) gewählt (c-Met, Akt1(PKB) und Erk1/2: n=3; Mek1/2: n=2).

B. Differentielle Phosphorylierungen an Kinasen in der HGF/SF-c-Met-Signalkaskade

In diesem Experiment wurden insgesamt 103 Phosphorylierungs-Stellen an 48 Proteinen detektiert. Davon konnten 77 (75%) zu Proteinen der Kinasefamilie zugeordnet werden. Die Regulationsanalyse führte zur Identifizierung von sieben differentiell regulierten von humanen Kinasen stammenden phosphorylierten Peptiden (Tab. III.13).

Tab. III.13: Phosphorylierte Peptide von Kinasen, die nach HGF/SF-Stimulation als reguliert detektiert wurden.

Protein			Phosphoryliertes Peptid			
Protein Name ^a	Protein Score ^b	Regulationsfaktor ^c	Peptid-Sequenz	pSTY	Peptid Score ^b	Regulationsfaktor ^c
Nek9	734	0.8	SSpTVTEAPIAVVTSR	T ³³³	72	9.9
	734	0.8	SSTVpTEAPIAVVTSR	T ³³⁵	28	8.1
MK01	325	0.9	VADPDHDHTGFLpTEpYVATR	T ¹⁸⁴ Y ¹⁸⁶	36	38.2
MK03	233	0.8	IADPEHDHTGFLpTEpYVATR	T ²⁰¹ Y ²⁰³	23	28
GSK3A	615	0.8	TSpSFAEPGGGGGGGGGGPGGSASGPGGTGGGK	S ²¹	137	3.2
AAPK1	759	0.6	SGpSVSNYR	S ⁴⁸⁷	38	7.3
MLTK	96	0.8	SSpSPTQYGLTK	S ⁶³⁷	60	0.4

a: UniprotKB/Swiss-Prot 51.0; b: Mascot-Ergebnis; c: iTRAQassist-Regulationsfaktoren

In Übereinstimmung mit der InIB₃₂₁ aktivierten c-Met-Kaskade erschienen die doppelt phosphorylierten Peptide aus den Kinase-Domänen von Erk1 (MK03, pT²⁰¹/pY²⁰³) und Erk2 (MK01, pT¹⁸⁴/pY¹⁸⁶) mit Regulationswerten von 28 und 38.2 im Vergleich zum Kontroll-Ansatz als stark reguliert. Die Phosphorylierung dieser [TEY]-Motife nach HGF/SF-Stimulation wurde bereits in Westernblot-Analysen gezeigt (Abb. III.32A). Das inhibitorisch auf die Kinase-Aktivität von GSK3A wirkende Serin S²¹ wurde im Vergleich zu InIB₃₂₁ ebenfalls nach HGF/SF-Stimulation phosphoryliert. Das GSK3A-Peptid TSpS²¹FAEPGGGGGGGGGGPGGSASGPGGTGGGK konnte mit einem Faktor von 3.2 in Analogie zur InIB₃₂₁-Aktivierung als hochreguliert identifiziert werden.

In Westernblot-Analysen nach vierminütiger HGF/SF-Stimulation von HeLa S3-Zellen wurde die mittels iTRAQassist quantifizierte Phosphorylierung am Serin S²¹ von GSK3A bestätigt. Das zu GSK3A-S²¹ homologe Serin S⁹ von GSK3B wurde zwar massenspektrometrisch nicht erfasst, eine HGF/SF-induzierte Hochregulation der Phosphorylierung an Serin S⁹ konnte allerdings im Westernblot demonstriert werden (Abb. III.33). Das an Serin S⁴⁸⁷ phosphorylierte Peptid SGpS⁴⁸⁷VSNYR der Kinase AMPKα-1 (AAPK1) wurde nach HGF/SF-Stimulation wie bereits für die InIB₃₂₁-Aktivierung gezeigt als reguliert gefunden (Tab. III.13). Die Regulation fiel in diesem Experiment mit einem Faktor von 7.3 deutlich stärker aus als nach Behandlung der HeLa S3-Zellen mit dem *listeriellen* Liganden InIB₃₂₁ (Faktor 2.2, Tab. III.7).



Abb. III.33: HGF/SF induziert die inhibitorisch wirkenden Phosphorylierungen an den Serinen S²¹ und S⁹ der Kinasen GSK3A und GSK3B. Durch den Einsatz spezifischer Antikörper konnte die massenspektrometrisch charakterisierte differentielle Phosphorylierung an ^{pS}²¹ von GSK3A bestätigt werden. Das Peptid TT^{pS}⁹FAESCKPVQQPSAFGSMK der Kinase GSK3B wurde in der HGF/SF-Phosphokinom-Studie nicht identifiziert. Im Westernblot erkennt man allerdings eine HGF/SF-induzierte Phosphorylierung von pS⁹ in GSK3B.

Ebenfalls in Übereinstimmung mit der InIB₃₂₁-aktivierten c-Met-Signalkaskade konnte auch nach HGF/SF-Induktion das Threonin T³³³ im Peptid SS^{pT}³³³VTEAPIAVVTSR der Serin/Threonin-Kinase Nek9 mit einem Wert von 9.9 als signifikant differentiell phosphoryliert identifiziert werden (Abb. III.34).

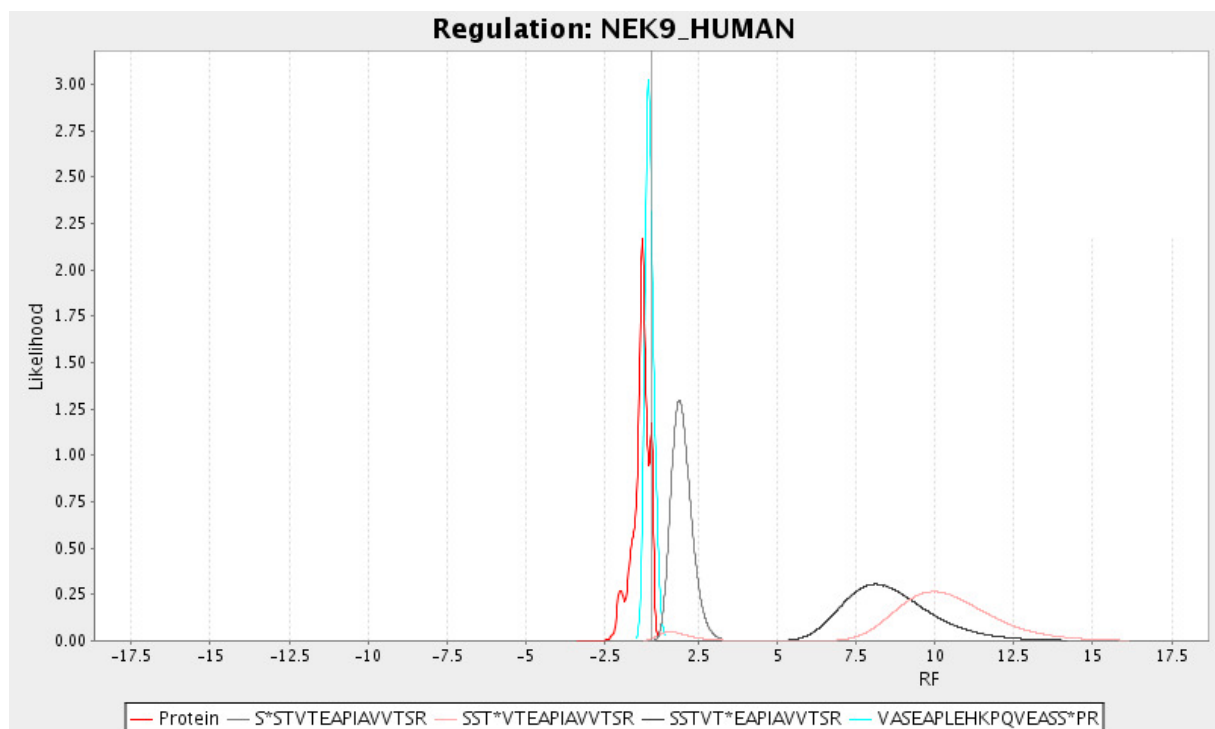


Abb. III.34: HGF/SF induziert differentielle Phosphorylierungen in der Serin/Threonin-Kinase Nek9. Wie bereits für InIB₃₂₁ identifiziert, konnte nach HGF/SF-Stimulation eine signifikante (Faktor 9.9) differentielle Phosphorylierung am Threonin T³³³ im Peptid SS^{pT}³³³VTEAPIAVVTSR (Mascot Score 72) identifiziert werden. Zusätzlich konnte dasselbe Peptid mit einer regulierten Phosphorylierung am Threonin T³³⁵ identifiziert werden, wobei dieses Peptid nur mit einem geringen Score (28) identifiziert wurde. Das am Serin S³³¹-phosphorylierte Peptid war mit einem Score von 69 signifikant identifiziert, mit einem Faktor von 1.9 aber nur schwach reguliert. Ein weiteres Peptid mit einer Phosphorylierung am Serin S⁸⁶⁹ (VASEAPLEHKPQVEAS^{pS}⁸⁶⁹PR) war nicht reguliert (Aminosäure links neben dem Stern trägt die Phosphorylierung).

Zusätzlich zu dem **pT³³³**-Peptid wurde dieselbe Aminosäuresequenz mit einem weitaus geringeren Mascot Mowse Score von 28 mit einer Phosphorylierung am Threonin T³³⁵ identifiziert, dessen Regulationsfaktor mit 8.1 ebenfalls als signifikant erschien. Dasselbe Peptid mit einer Phosphorylierung am Serin S³³¹ wurde zwar signifikant identifiziert (Score 69), die Regulation fiel allerdings mit einem Faktor von 1.9 deutlich schwächer aus als für die pT³³³- und pT³³⁵-tragenden Peptide. Ein weiteres Peptid der Kinase Nek9, welches eine Phosphorylierung am Serin S⁸⁶⁹ besitzt, war nach HGF/SF-Behandlung nicht reguliert (Abb. III.34).

Ein nach HGF/SF-Aktivierung mit einem Faktor von 0.4 reguliertes phosphoryliertes Peptid konnte zur MAP-Kinase MLTK (Mixed Lineage Kinase-like Mitogen-activated Protein Triple Kinase) zugeordnet werden (Abb. III.35).

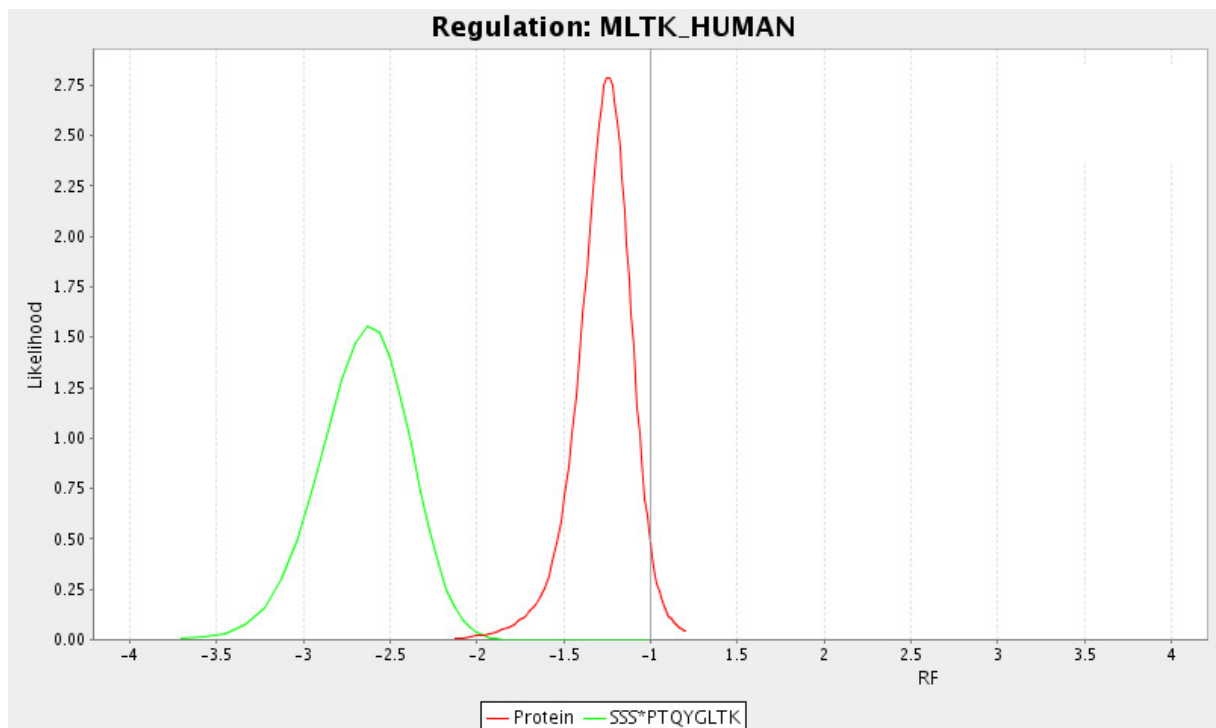


Abb. III.35: HGF/SF-induzierte Regulation des phosphorylierten Peptides SS**pS⁶³⁷**PTQYGLTK der MAP-Kinase MLTK. Der Regulationswert nach vierminütiger Stimulation betrug 0.4. Die Wahrscheinlichkeitskurve der Proteinregulation besitzt ein Maximum bei einem Wert von 0.8 (Aminosäure links neben dem Stern trägt die Phosphorylierung).

Die phosphorylierte Aminosäure Serin S⁶³⁷ ist mit je einem Eintrag in den Datenbanken Uniprot/Swissprot und Phosphosite versehen. Nach InIB₃₂₁-Stimulation wurde das Peptid SS**pS⁶³⁷**PTQYGLTK ebenfalls detektiert. Die Regulationswerte betrugen in den einzelnen Experimenten 1.5 (InIB₃₂₁, Experiment 1), 0.9 (InIB₃₂₁, Experiment 2) und 0.7 (InIB₃₂₁/StreptIIc WT), weshalb das Peptid nach InIB₃₂₁-

Stimulation als nicht reguliert angesehen wurde. Der nach HGF/SF-Stimulation bestimmte Regulationswert von 0.4 fiel deutlich signifikanter aus (Abb. III.35).

Die für die InIB₃₂₁- (Tab. III.7; Tab. III.8) bzw. InIB₃₂₁/StreptIIIC WT- (Tab. III.10; Tab. III.11) Aktivierung der c-Met-Signalkaskade identifizierten differentiell phosphorylierten Peptide der Kinasen KS6A3 (RSK-2) und MP2K2 (Mek2) bzw. CDKL5 und MARK1/2/3 sowie der Proteine ohne Kinase-Aktivität ACLY, CABL1 und K0528 wurden nach HGF/SF-Induktion proteomisch nicht erfasst. Aus diesem Grund kann keine Aussage über eine mögliche differentielle Phosphorylierung nach Aktivierung der c-Met-Kaskade mit dem physiologischen Liganden getroffen werden. Im Gegensatz hierzu wurde das nach InIB₃₂₁/StreptIIIC WT-Behandlung mit einem Faktor von 0.5 als reguliert identifizierte phosphorylierte Peptid der Kinase RIOK2 (Tab. III.11) auch nach HGF/SF-Stimulation sequenziert. Eine Regulation zeigte das am Serin S³⁵⁰ phosphorylierte Peptid AEVYG**p**SENESER nach HGF/SF-Behandlung der Zellen nicht (Faktor: 0.9).

5. InIB₃₂₁-und HGF/SF-induzierte Proteinregulationen in der c-Met-Signalkaskade

Neben der Regulation von phosphorylierten Peptiden konnte in den nach Abb. III.1 durchgeführten Phosphokinom-Studien in wenigen Fällen eine Regulation von Proteinen selbst detektiert werden.

Die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met wurde in vier von fünf Experimenten identifiziert. Keines der sequenzierten c-Met-Peptide trug eine Phosphorylierung oder besaß eine bekannte potentielle Phosphorylierungs-Stelle. Die iTRAQassist-Analyse zeigte nach InIB₃₂₁- und InIB₃₂₁/StreptIIIC WT-Stimulation eine negative Regulation aller detektierten c-Met-Peptide in Bezug auf das jeweilige Kontrollsystem (Abb. III.36A). Der maximal wahrscheinliche Regulationsfaktor nach InIB₃₂₁-Stimulation lag bei Werten von 0.6 (Experiment 1 und 3) und 0.5 (Experiment 2). Nach InIB₃₂₁/StreptIIIC WT-vermittelter Aktivierung der c-Met-Signalkaskade wurde ein Regulationsfaktor von 0.4 ermittelt. In dem HGF/SF-Induktionsexperiment konnte c-Met nicht detektiert werden (Tab. III.14). Da die Autophosphorylierung der c-Met-Kinase-Domäne innerhalb der ersten beiden Minuten nach Liganden-Präsentation bereits einen maximalen Wert erreichte (Abb. III.18), kann die nach vierminütiger InIB₃₂₁-Stimulation beobachtete Regulation von c-Met entweder auf eine Verringerung der Affinität zu V16743 durch strukturelle Änderungen oder durch bereits einsetzende Degradationsprozesse erklärt werden. Die Dual-spezifische MAP-Kinase Mek1 (MP2K1) wurde im Gegensatz zu c-Met als hochreguliert identifiziert (Abb. III.36B). Sowohl nach HGF/SF- als auch nach InIB₃₂₁-

Stimulation lagen die maximal wahrscheinlichen Regulationswerte zwischen einem Faktor von 2.5 und 3.0 (Tab. III.14), wobei nach InIB₃₂₁/StreptIIc WT-Stimulation sogar zwei Maxima bestimmt wurden. Von der Kinase MP2K1 wurde kein phosphoryliertes Peptid identifiziert, dass eventuell Aufschluss über strukturelle Änderungen oder den Aktivitätsstatus durch posttranslationale Modifikation geben könnte.

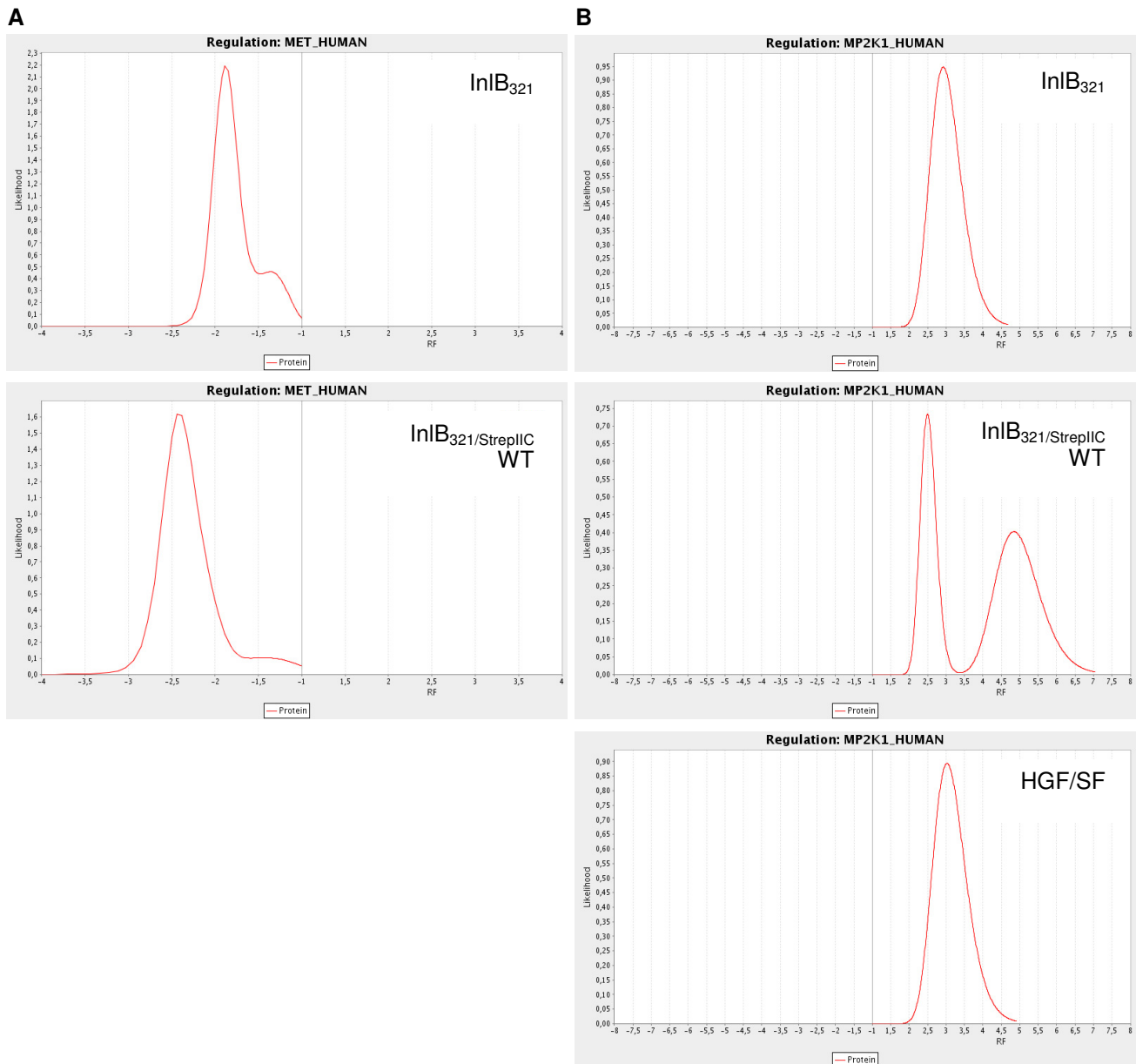


Abb. III.36: Änderung der Protein-Regulation nach Aktivierung der c-Met-Signalkaskade. (A) Für die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met wurde nach Stimulation mit InIB₃₂₁ und InIB₃₂₁/StreptIIc WT ein Regulationsfaktor von 0.6 und 0.4 ermittelt. In dem HGF/SF-Induktions-Experiment wurde c-Met nicht detektiert. (B) Mek1 (MP2K1) wurde nach Aktivierung der c-Met-Signalkaskade durch InIB₃₂₁ (RF_{max.} 2.9), InIB₃₂₁/StreptIIc WT (RF_{max.} 2.5) und HGF/SF (RF_{max.} 2.9) als hochreguliert detektiert (RF_{max.}: nach der Maximum Likelihood-Methode bestimmter wahrscheinlichster Regulationsfaktor).

Eine HGF/SF-spezifische Regulation konnte für die MAP-Kinase MP2K6 detektiert werden (Abb. III.37): während nach InIB₃₂₁-vermittelter Aktivierung der c-Met-Signalkaskade keine Regulation auf das Bezugs-System festgestellt wurde, wurden nach HGF/SF-Stimulation zwei Maxima in der Regulationskurve der Kinase MP2K6 ermittelt. Das größere Maximum der Kurve lag bei einem Regulationswert von 2.3 (Tab. III.14). Ein phosphoryliertes Peptid wurde nicht detektiert.

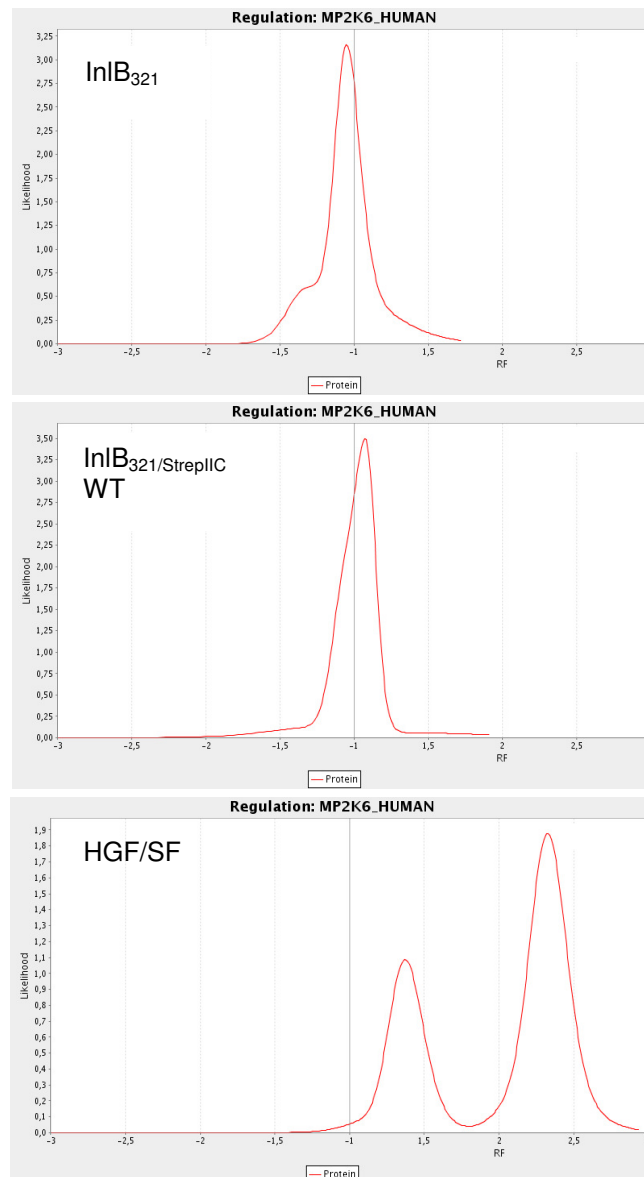


Abb. III.37: HGF/SF-spezifische Änderungen in der Proteinregulation der MAP-Kinase MP2K6. MP2K6 wurde nur nach HGF/SF-Stimulation mit einer erhöhten Regulation detektiert, wobei die Regulationskurve zwei Maxima besitzt (RF_{max.}: 1.4 und 2.3), nach InIB₃₂₁-Aktivierung erschien das Protein als nicht reguliert.

In Tabelle III.14 sind die iTRAQassist-kalkulierten Protein-Regulationen an Kinasen der Einzel-Experimente mit den jeweils zugehörigen Mascot Mowse Score-Werten zusammengefasst.

Tab.III.14: Differentielle Proteinregulationen an Kinasen nach Aktivierung des c-Met-Signalweges.

Ligand(en)	InIB ₃₂₁ (Exp.1)		InIB ₃₂₁ (Exp.2)		InIB ₃₂₁ (Exp.3)		InIB ₃₂₁ /StrepCII WT InIB ₃₂₁ /StrepCII LoF		HGF/SF	
Protein Name ^a	Protein Score ^b	Regulationsfaktor ^c	Protein Score ^b	Regulationsfaktor ^c	Protein Score ^b	Regulationsfaktor ^c	Protein Score ^b	Regulationsfaktor ^c	Protein Score ^b	Regulationsfaktor ^c
MET	183	0.6	76	0.5	26	0.6	107	0.4	n.d.	n.d.
MP2K1	n.d.	n.d.	48	2.9	28	3.0	34	2.5	37	2.9
MP2K6	292	0.9	161	0.9	105	1.2	261	1.1	199	2.3

a: UniprotKB/Swiss-Prot 51.0; b: Mascot-Ergebnis; c: iTRAQassist-Regulationsfaktoren; Exp.: Experiment; n.d.: nicht detektiert; Hinterlegung: gelb: Regulationswert ≤ 0.6 , türkis: Regulationswert ≥ 1.8 ; grau: nicht reguliert.

Unter den Proteinen ohne Kinase-Aktivität erschienen Prohibitin (PHB) und Prohibitin-2 (PHB2) als reguliert (Abb. III.38). Beide Proteine haben eine Sequenzhomologie von 53% und wurden durch spezifische Peptide identifiziert. Während nach vierminütiger InIB₃₂₁-Stimulation tendenziell eine negative Regulation von PHB (RF_{\max} : 0.6) und PHB2 (RF_{\max} : 0.9) beobachtet werden konnte, wurde nach HGF/SF-Aktivierung der c-Met-Signalkaskade ein Regulationsfaktor von 5.0 für PHB und 4.0 für PHB2 festgestellt. Die Identifizierung beider Proteine erfolgte in je einem Experiment nach InIB₃₂₁- und nach HGF/SF-Stimulation.

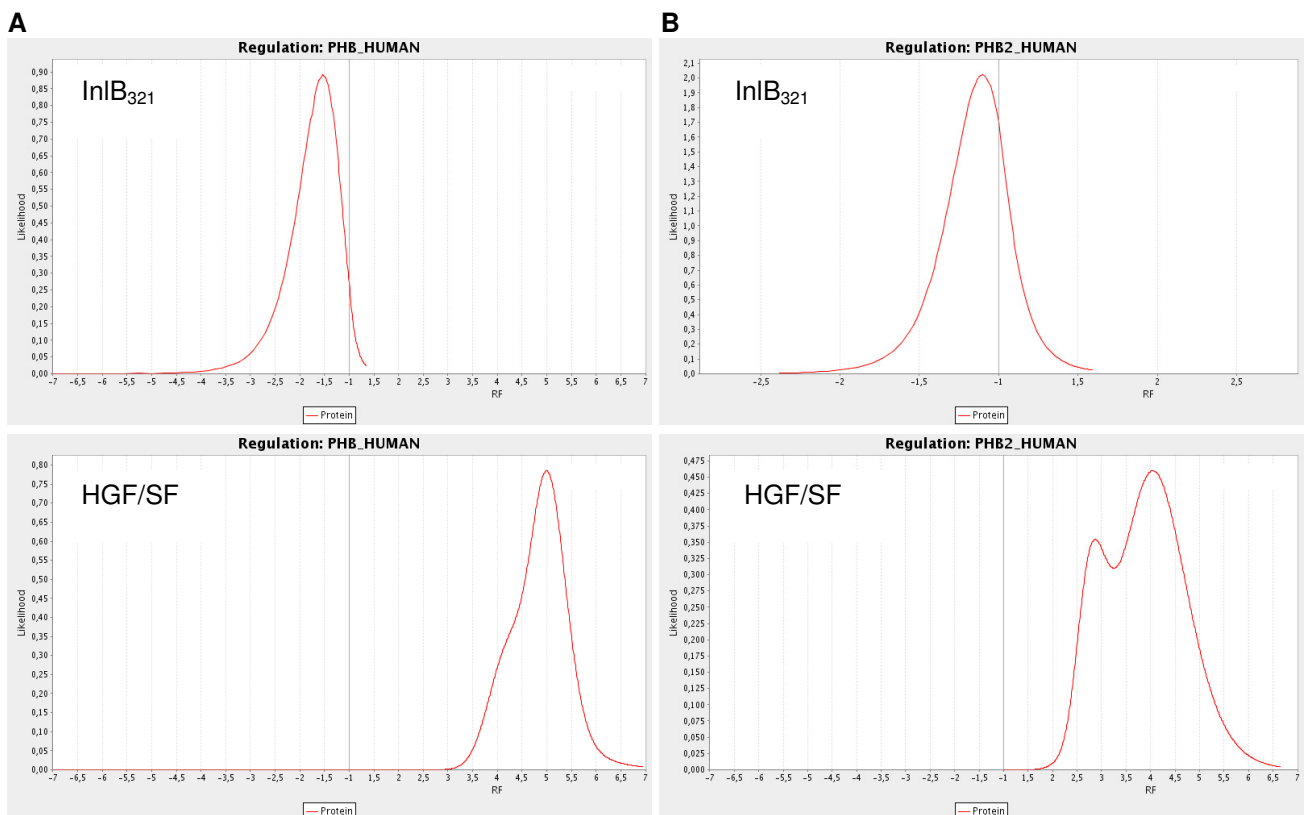


Abb. III.38: Differentielle Proteinregulation von Prohibitin und Prohibitin-2. (A) Prohibitin (PHB) wurde nach HGF/SF-Stimulation mit einem maximal wahrscheinlichen Regulationsfaktor von 5.0 identifiziert, wohingegen die InIB₃₂₁-Präsentation keinen Einfluss auf die PHB-Proteinregulation hatte. (B) Ebenso erschien Prohibitin-2 (PHB2) nur nach vierminütiger HGF/SF-induzierter Aktivierung der c-Met-Signalkaskade mit einem Faktor von 4.0 als reguliert.

6. Analysen zur Funktion der Kinase Nek9 im c-Met-Signalweg

Die positive Regulation von Threonin T³³³ der Serin/Threonin-Kinase Nek9 konnte in allen Experimenten konsistent mit Regulationsfaktoren von 10.1, 5.9 und 3.8 (InlB₃₂₁) sowie 2.3 (InlB₃₂₁/StreptIIc WT) und 9.9 (HGF/SF) identifiziert werden (Tab. III.7/10/13). Da Nek9 bisher nicht im Zusammenhang mit der c-Met-Signalkaskade beschrieben wurde, wurde in abschließenden Experimenten mit einer initialen Charakterisierung von Nek9 in der c-Met-Signalübertragung begonnen.

A. Der InlB₃₂₁-vermittelte Einfluss auf Nek9-Protein-Interaktionen

Die differentielle Phosphorylierung von Nek9-Threonin T³³³ konnte bereits deutlich nach vierminütiger c-Met-Stimulation detektiert werden. Somit sollte eine schnell ablaufende Signalübertragung zugrunde liegen, weshalb die Annahme getroffen wurde, dass Nek9 ähnlich wie die beispielsweise sehr schnell im c-Met-Signalweg phosphorylierten Kinasen Erk1 und Erk2, im Cytosol der Zelle lokalisiert sein könnte. Um mögliche mit Nek9 interagierende Proteine zu charakterisieren, wurde deshalb ein cytosolischer HeLa S3-Zellextrakt durch schonende Lyse mit dem Detergenz Igepal CA630 unter Niedrigsalz-Bedingungen und ohne Einsatz von Ultraschall hergestellt. Nach Vorreinigung mit ProteinG-beschichteten Magnet-Beads wurde der Zellextrakt mit α -Nek9-pAB beschichteten ProteinG-Magnet-Beads inkubiert. Nach ausführlichem Waschen der Magnet-Beads aus der Vorreinigung und aus der α -Nek9-Immunopräzipitation wurden gebundene Proteine eluiert, in einem 10%igen PA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (Abb. III.39).

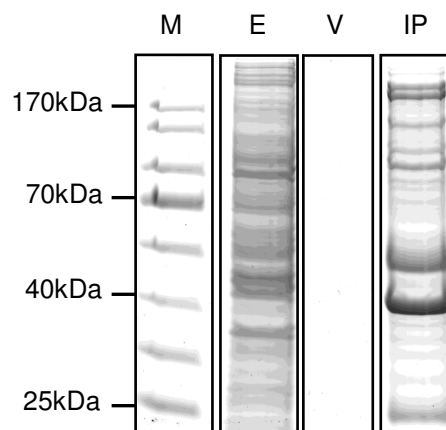
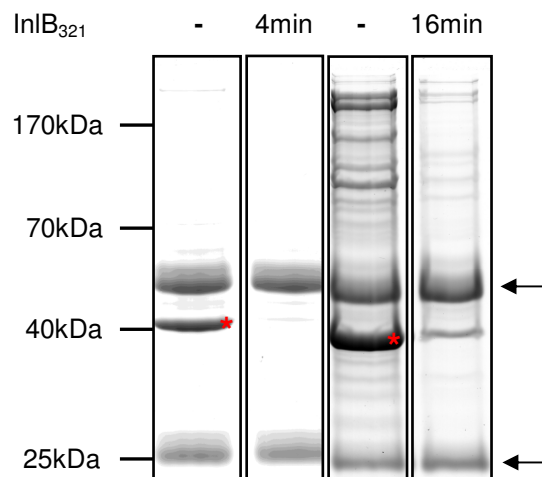


Abb. III.39: Proteinbanden-Muster im α -Nek9-pAB-Immunopräzipitat. Ein cytosolischer Proteinextrakt wurde mit ProteinG-beschichteten Beads vorgereinigt und anschließend mit α -Nek9-pAB-beschichteten ProteinG Beads inkubiert. Ein Aliquot des Proteinextrakts (E) und die Eluate der Vorreinigung (V) und der α -Nek9-pAB-beschichteten Beads (IP) sind in einem 10% PA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Fast-Silver angefärbt (M: Marker)

Das Bandenmuster des Eluates der α -Nek9-IP (IP) erschien deutlich unterschiedlich zum Bandenmuster des Lysates (E) und war relativ komplex, während durch dieselbe Menge an ProteinG-beschichteten Magnet-Beads ohne α -Nek9-Antikörper (V) nahezu keine Proteine angereichert wurden.

In weiteren Ansätzen wurde untersucht, ob eine Aktivierung der c-Met Signalkaskade durch InIB_{321} eine Veränderung des Bandenmusters eines α -Nek9-pAB-IP-Eluates bewirken kann und somit einen Einfluss auf mögliche Nek9-Interaktionen ausübt. Zu diesem Zweck wurden in Serum-freiem Medium konditionierte HeLa S3-Zellen für vier und für 16 Minuten mit 10nM InIB_{321} stimuliert. Von diesen Stimulations-Ansätzen und von Kontroll-Ansätzen wurden erneut cytosolische Proteinextrakte hergestellt. Nach Vorreinigung mit ProteinG-Beads wurde Nek9 in jedem der Ansätze mit α -Nek9-pAB-beschichteten Magnet-Beads angereichert. Die Eluate der α -Nek9-pAB-IP nach InIB_{321} -Induktion wurden erneut gelelektrophoretisch analysiert und sind in Abb. III.40 zu sehen.



Ab. III.40: InIB_{321} -Stimulation beeinflusst das Bandenmuster des α -Nek9-pAB-Immunopräzipitats. Serum-frei konditionierte HeLa S3-Zellen wurden mit 10nM InIB_{321} für vier und 16 Minuten bzw. ohne InIB_{321} behandelt. Cytosolische Extrakte wurden anschließend in einer α -Nek9-pAB-Immunopräzipitation eingesetzt. Die Eluate wurden in einem 10% PA-Gel aufgetrennt und angefärbt. Das Bandenmuster zwischen Induktions- und Kontroll-Ansätzen ist deutlich unterschiedlich. Der Stern markiert ein ca. 40kDa schweres Protein, welches nach Induktion mit InIB_{321} durch eine α -Nek9-pAB-Immunopräzipitation nahezu nicht mehr angereichert wird (Pfeil: schwere und leichte Antikörperbanden des α -Nek9-pAB).

Das resultierende Bandenmuster nach vier- und 16-minütiger InIB_{321} -Behandlung unterschied sich signifikant im Vergleich zu den Kontroll-Ansätzen. Während in diesen ein semikomplexes Proteinmuster angefärbt werden konnte, erschien die Menge und Diversität der über den α -Nek9-pAB angereicherten Proteine nach c-Met-Aktivierung stark abzunehmen. Besonders auffällig war eine Bande mit einem geschätzten Molekulargewicht von ca. 40kDa (Abb. III.40, Stern), die in den Kontroll-

Ansätzen deutlich vorhanden war, in den Induktions-Ansätzen allerdings nur noch schwach angefärbt wurde. Zur Identifizierung möglicher Nek9-interagierender Proteine wurden die eindimensional getrennten Proteine aus dem Kontroll-Ansatz in sieben Gelbereiche unterteilt und ausgeschnitten (Abb. III.41). Dabei wurden die Bereiche um 50kDa und 25kDa nicht mit einbezogen, da diese Banden zu den schweren und leichten Antikörper-Ketten des α -Nek9-pAB korrespondieren (Abb. III.40, Pfeil). Die Proteine der sieben ausgeschnittenen Gel-Bereiche wurden tryptisch verdaut, die Peptide extrahiert und über HPLC-ESI-MS/MS analysiert.

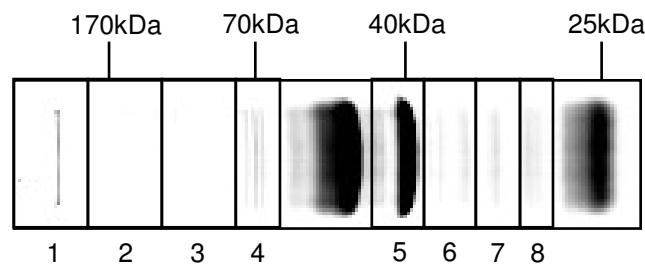


Abb. III.41: Zur Proteinidentifizierung ausgewählte Gelbereiche eines eindimensional getrennten Eluates einer α -Nek9-pAB-Immunopräzipitation. Nach tryptischem In-Gel-Verdau wurden die extrahierten Peptide der markierten Gelbereiche mittels HPLC-ESI-MS/MS analysiert. Das Präzipitat stammte aus einer nicht-induzierten Probe (Abb. III.40, linke Gelspur).

In Bande 5, die den signifikantesten Unterschied zwischen Kontroll- und InIB₃₂₁-Ansatz zeigte, konnten drei Proteine identifiziert werden. Neben einem ribosomalen Protein (Mascot Score 35) und einem Elongationsfaktor (Mascot Score 52) war Aktin mit einem Score von 343 das primär in der Bande 5 enthaltene Protein. Die angereicherte Proteinkinase Nek9 wurde in Bande 3 mit einem Score von 197 eindeutig detektiert, trotzdem in diesem Bereich kaum Proteine angefärbt werden konnten. Neben Aktin wurden vermehrt Aktinzytoskelett-assoziierte Proteine wie α -Actinin-1 und α -Actinin-2, Filamine, Spectrin, Drebrin, ERM-Proteine, CapZ α -1 und Proteine des Arp2/3-Komplexes identifiziert. Zusätzlich konnte das extrazelluläre Matrixprotein CD44 identifiziert werden, welches in der Splice-Variante CD44v6 als Ko-Rezeptor für c-Met beschrieben ist (Orian-Rousseau et al., 2002). ERM-Proteine (Ezrin/Radixin/Moesin) agieren als Linker zwischen dem Aktinzytoskelett und dem Matrixprotein CD44. Die Interaktion von ERM-Proteinen mit CD44 ist in verschiedenen Zelltypen essentiell für die HGF/SF-c-Met-vermittelte Aktivierung der RasGTPase (Orian-Rousseau et al., 2007). Weitere Proteine konnten Degradations-Prozessen (Ubiquitin, COP9 Signalosom), endozytotischen Prozessen (Clathrin) und Signalprozessen (G-Protein-assoziierte Proteine) zugeordnet werden und sind in

Tab. III.15 zusammengefasst. Die im jeweiligen Molekulargewichts-Bereich mit dem höchsten Score identifizierten Proteine sind grau hinterlegt.

Tab. III.15: Potentielle Nek9-assoziierte Proteine.

1D PAGE	Protein Name ^a	Score ^b	Masse [Da] ^b	Beschreibung ^c	Merkmal ^d
1	ACTN1	110	103563	Alpha-Actinin-1	
1	FLNA	559	283170	Filamin-A	
1	FLNB	39	280188	Filamin-B	
1	SPTA2	628	285162	Spectrin Alpha Chain	
3	ACTN4	221	105245	Alpha-Actinin-4	
3	DREB	93	71707	Drebrin	
3	MYO1C	257	118763	Myosin Ic	
3	CD44	34	82017	CD44 antigen	Zytoskelett-assoziiert
3	PLAK	58	82245	Junction plakoglobin	
4	EZRI	33	69339	Ezrin/Moesin/Radixin	
5	ACTB	343	42052	Beta-Actin	
6	ARP2	195	45017	Actin-like protein 2	
7	ARC1A	121	42113	Actin-related protein 2/3 complex su 1A	
7	ARC1B	107	41591	Actin-related protein 2/3 complex su 1B	
7	CAZA1	154	32942	CapZ alpha-1	
8	ANXA2	121	38677	Annexin A2	
2	CLH1	284	193129	Clathrin heavy chain 1	Endozytose
4	DAF	147	42400	CD55 antigen	Komplement
2	LMO7	644	194016	LIM domain only protein 7	
2	UBIQ	56	8560	Ubiquitin	
6	CSN4	134	46525	COP9 signalosome complex subunit 4	Degradation
7	MCA1	44	34616	Multisynthetase complex comp. p43	
7	MCA2	52	35668	Multisynthetase complex comp. p38	
8	PSDE	38	34726	26S proteasome non-ATPase rs 14	
3	NEK9	197	108868	Nek9	Kinase
1	PRKDC	55	473749	DNA-PKcs	
7	PP1A	301	38229	phosphatase PP1-alpha catalytic su	
7	PP1B	255	37830	phosphatase PP1-beta catalytic su	Phosphatase
1	TRAP1	42	80345	TNFR-associated Protein 1	
4	GRP75	251	73920	Stress-70 protein	
4	HSP71	188	70280	Heat shock 70 kDa protein 1	
4	HSP7C	412	71082	Heat shock cognate 71 kDa protein	Chaperon
3	HS90B	90	83423	Heat shock protein HSP 90-beta	
3	HSP74	110	95096	Heat shock 70 kDa protein 4	
6	GNAI2	236	40864	Guanine nucleotide-binding protein G(i)	
6	GNAI3	186	40945	Guanine nucleotide-binding protein G(k)	
8	GBB2	158	37917	Transducin beta chain 2	Signalübertragung
8	GBB4	118	38153	Transducin beta chain 4	
6	PCBP1	86	37987	Poly(rC)-binding protein 1	
6	RFC2	51	39588	Replication factor C subunit 2	Replikation/Transkription
7	RFC4	60	40170	Replication factor C subunit 4	
8	PCNA	263	29092	Proliferating cell nuclear antigen	
2/3	CPSM	257	165975	Carbamoyl-phosphate synthase	
3	GPIA1	47	72935	p137GPI	
3	HBB	50	15971	Hemoglobin	
6	ALDOA	80	39720	Fructose-bisphosphate aldolase A	Stoffwechsel
6	ALDOB	64	39830	Fructose-bisphosphate aldolase B	
7	G3P	298	36070	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	
7	TALDO	46	37688	Transaldolase	
1	IF4A1	32	46353	Eukaryotic initiation factor 4A-1	
2	RLA0	117	34423	60S acidic ribosomal protein P0	
2	SYIC	36	146178	Isoleucyl-tRNA synthetase	
3/1	EF2	123	96115	Elongation factor 2	
4	PABP1	44	70854	Polyadenylate-binding protein 1	
5	RSSA	35	32816	40S ribosomal Protein SA	Translation
7	ROA2	45	37464	HNRNP A2/B1	
8	FBRL	32	33877	fibrillarin	
8	RL5	36	34438	60S ribosomal protein L5	
8	ROA1	32	38805	HNRNP A1	
8/5	EF1A1	52	50451	Elongation factor 1-alpha 1	
2	CD109	486	162500	CD109 antigen	
2	DSG2	132	123050	Desmoglein-2	
2	LYSC	50	16982	Lysozyme C	
2	TBB2C	98	50255	Tubulin beta-2C chain	
3	4F2	109	58023	4F2 cell-surface antigen heavy chain	
3	C1TC	59	102049	C1-THF-Synthase	
3	GANAB	198	107263	Neutral alpha-glucosidase	Andere
3/4	ABCG2	179	72952	ATP-binding cassette su G member 2	
7	FOLR1	92	30712	Folate receptor alpha precursor	
7	TIM50	36	39850	Import inner membrane translocase TIM50	
8	LDHB	45	36769	L-lactate dehydrogenase B chain	
8	PHB2	57	33276	Prohibitin-2	

a/c/d: UniprotKB/Swiss-Prot 51.0; b: Mascot; graue Hinterlegung: Proteine, die im jeweiligen Bandenbereich des PA-Gels (Abb. III.41) den höchsten Mascot-Score erhalten haben.

B. Der InlB₃₂₁-vermittelte Einfluss auf die Lokalisation von Nek9

Die auffällige Abnahme der Aktin-Bande im Eluat einer α -Nek9-pAB-Immunopräzipitation nach InlB₃₂₁-Stimulation kann daraus resultieren, dass eine mögliche direkte oder indirekte Interaktion von Nek9 zum Aktinzytoskelett nach Aktivierung der c-Met Signalübertragung unterbunden wird. Aus den in Abb. III.40 gezeigten eindimensional getrennten Eluaten einer α -Nek9-pAB-IP ging nicht hervor, ob Nek9 vor und nach InlB₃₂₁-Stimulation in gleichen Mengen angereichert wurde. Da Nek9 sowohl als zytoplasmatisches (Roig et al., 2002) wie auch als nukleäres (Tan und Lee, 2004) Protein beschrieben wurde, ist eine c-Met-abhängige Funktion von Nek9 mit einer kontrollierten Verteilung in beiden Kompartimenten denkbar. Um dies näher zu charakterisieren, wurden Serum-frei konditionierte semikonfluente HeLa S3-Zellen in einem Zeitraum bis 16 Minuten mit 10nM InlB₃₂₁ behandelt. Nek9 wurde anschließend aus zytoplasmatischen Extrakten über einen polyklonalen α -Nek9-Antikörper angereichert. Die Eluate sowie Proben der cytosolischen Extrakte wurden in einer 10%igen PA-Gelelektrophorese getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. In den Extrakt-Proben wurde die Aktivierung der c-Met-Kinase-Domäne mit einem spezifischen Antikörper gegen die phosphorylierten Tyrosine Y¹²³⁴ und Y¹²³⁵ detektiert. Die Detektion zellulären Aktins in den Extrakt-Proben diente als Normalisierungs-Basis. In den IP-Eluaten wurde die Anwesenheit von Nek9 und Aktin untersucht (Abb. III.42A). Wie bereits in vorausgehenden Experimenten beobachtet, induziert die InlB₃₂₁-Präsentation eine sehr schnelle Aktivierung der c-Met-Kinase-Domäne, die ihr Maximum bereits nach wenigen Minuten erreicht. Die Detektion von Nek9 in den IP-Eluat-Proben zeigte über den gesamten Induktionszeitraum betrachtet eine Abnahme in der Nek9-Signalstärke. Korrelierend mit den Ergebnissen aus den Coomassie Blue-Silver gefärbten eindimensionalen α -Nek9-IP-Eluaten nach InlB₃₂₁-Stimulation (Abb. III.40) konnte im Westernblot gezeigt werden, dass Aktin nach Stimulation mit InlB₃₂₁ nicht mehr über die α -Nek9-IP angereichert wird (Abb. III.42). Aus diesen Ergebnissen kann eine erste Annahme darüber getroffen werden, dass Nek9 nach InlB₃₂₁-vermittelter Aktivierung der c-Met Kaskade in Igepal-unlösliche Zellkompartimente transloziert. Weitere Möglichkeiten wären zum Einen eine Degradation von Nek9, wobei keinerlei Abbauprodukte im Westernblot detektiert wurden. Zum Anderen kommt eine aufgrund struktureller Veränderungen eintretende abnehmende Zugänglichkeit zu dem polyklonalen α -Nek9-Antikörper in Frage, der gegen einen 100 Aminosäuren umfassenden Bereich im C-Terminus gerichtet ist.

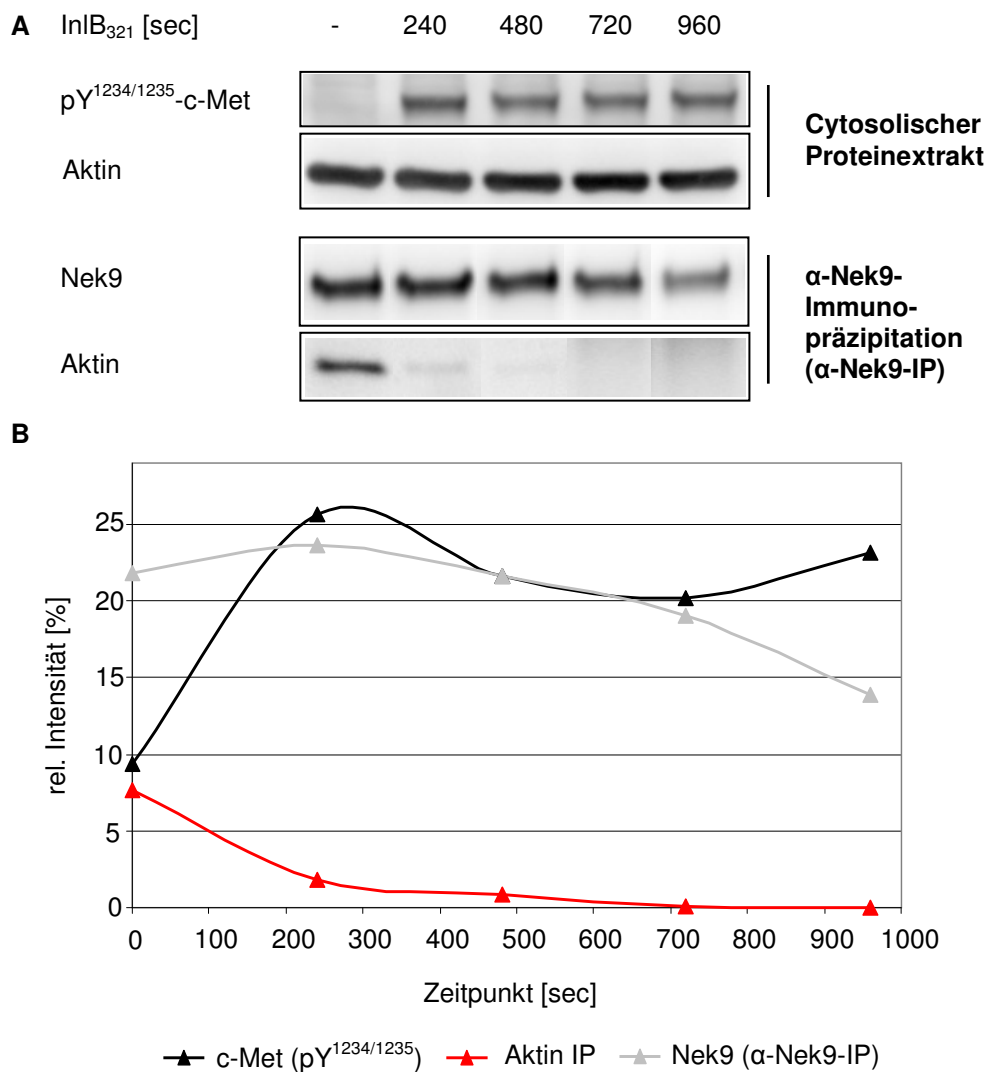


Abb. III.42: Der Einfluss von InIB₃₂₁ auf die cytosolische Lokalisation von Nek9. (A) HeLa S3-Zellen wurden für vier, acht, zwölf und 16 Minuten mit InIB₃₂₁ stimuliert. Cytosolische Extrakte wurden zur Anreicherung von Nek9 mit einem polyklonalen Antikörper eingesetzt. Die Aktivierung von c-Met und zelluläres Aktin im cytosolischen Extrakt sowie die Anreicherung von Nek9 und Aktin in den IP-Proben wurden durch spezifische Antikörper detektiert. (B) Die detektierten Westernblot-Signale wurden nach Normierung auf zelluläres Aktin densitometrisch quantifiziert. Während die c-Met-Aktivierung innerhalb der ersten Minuten nach InIB₃₂₁-Behandlung ein Maximum erreicht, nimmt das Nek9-Signal über den 16minütigen Zeitraum kontinuierlich ab. Aktin konnte nur in der unbehandelten Probe der IP-Eluat signifikant detektiert werden.

Ein spezifischer Antikörper gegen das phosphorylierte Threonin T³³³ von Nek9 stand zum Zeitpunkt dieser Analysen noch nicht zur Verfügung. Deshalb konnte nicht direkt charakterisiert werden, wie sich die Phosphorylierung an Threonin T³³³ in einer Zeit-abhängigen InIB₃₂₁-Stimulation verhält und ob diese einen Einfluss auf die bisher beobachteten Prozesse an Nek9 hat. Threonin T³³³ liegt in dem für Kinasen der AGC-Familie typischen Phosphorylierungs-Motif (R/K)X(R/K)XX(pT/pS) (X: beliebige Aminosäure; Pearson und Kemp, 1991). Ein Antikörper, der phosphorylierte Serine

und Threonine in einem solchen Motif erkennt, ist kommerziell verfügbar (Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrat Antikörper, α -pAktS-Antikörper, Cell Signaling Technology). Eine Sequenzanalyse von Nek9 zeigte, dass neben Threonin T³³³ auch Threonin T⁶²⁰ in einem AGC-Phosphorylierungs-Motif liegt (Abb. III.43A) und deshalb im phosphorylierten Zustand von diesem Antikörper erkannt werden könnte. Weder in Arbeitsgruppen-internen Datenbanken (Signaling DB, CPRO/HZI), in denen sämtliche experimentell identifizierten Phosphorylierungs-Stellen gespeichert und für Nek9 acht verschiedene phosphorylierte Aminosäuren vermerkt sind, noch bei einem Abgleich mit den Datenbanken Phosida, Phospho.ELM 6.0, Phosphosite und Uniprot 10.3 konnte ein Eintrag über eine bereits bekannte Phosphorylierung an Threonin T⁶²⁰ gefunden werden. Eine bioinformatisch gestützte Vorhersage auf Basis von Primärstruktur-Analysen zeigte für Threonin T³³³ im Vergleich zu Threonin T⁶²⁰ eine zehnfach erhöhte Oberflächenzugänglichkeit (Scansite, <http://scansite.mit.edu/>) (Abb. III.43B). Aufgrund des geringen Zugänglichkeits-Wertes und der Tatsache, dass keine Phosphorylierung an Threonin T⁶²⁰ bekannt ist, wurde der Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrat Antikörper eingesetzt, um den zeitlichen Einfluss der InlB₃₂₁-Stimulation auf die Phosphorylierung von Nek9 am Threonin T³³³ zu charakterisieren.

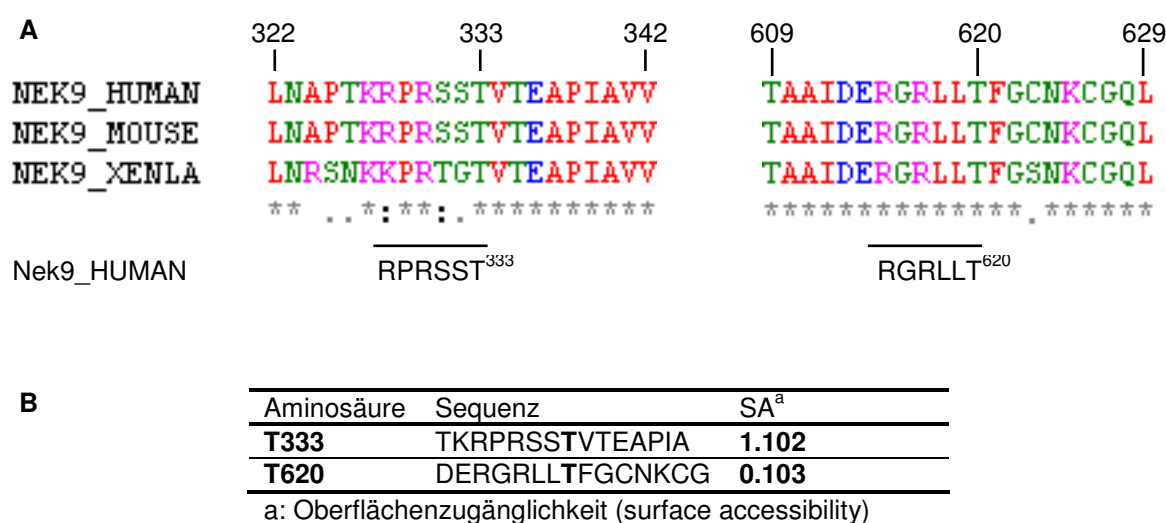


Abb. III.43: Zwei AGC-Kinase-Motive in Nek9 und deren Oberflächenzugänglichkeit. (A) Die Threonine T³³³ und T⁶²⁰ von Nek9 sind in Mensch, Maus und Frosch konserviert und liegen innerhalb eines typischen AGC-Kinase-Phosphorylierungsmotifs (ClustalW). (B) Der von Scansite bestimmte Wert der Oberflächenzugänglichkeit ist nahezu zehnmal höher für Threonin T³³³ als für Threonin T⁶²⁰.

Nach vier-, acht-, zwölf- und 16minütiger Stimulation mit 10nM InlB₃₂₁ wurden cytosolische Extrakte hergestellt und in diesen eine Immunopräzipitation mit dem Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrat Antikörper durchgeführt. Die eluierten Proteine wurden elektrophoretisch getrennt und nach Westernblot-Transfer auf eine PVDF-

Membran mit einem α -Nek9-pAB analysiert (Abb. III.44A). Nach Normierung auf zelluläres Aktin in den Lysat-Proben erfolgte eine densitometrische Quantifizierung (Abb. III.44B). In den IP-Eluaten konnte analog zu den IP-Eluaten nach α -Nek9-pAB-IP (Abb. III.42) eine Abnahme der Nek9 Signalstärke beobachtet werden. Die relative Abnahme des Nek9-Signals von der Kontroll-Probe zur 16-Minuten-Probe betrug in den α -Nek9-IP-Eluaten ca. 7% (Abb. III.42B), die relative Abnahme nach α -pAktS-IP umfasste ca. 35% (Abb. III.44B) und fiel damit viel deutlicher aus.

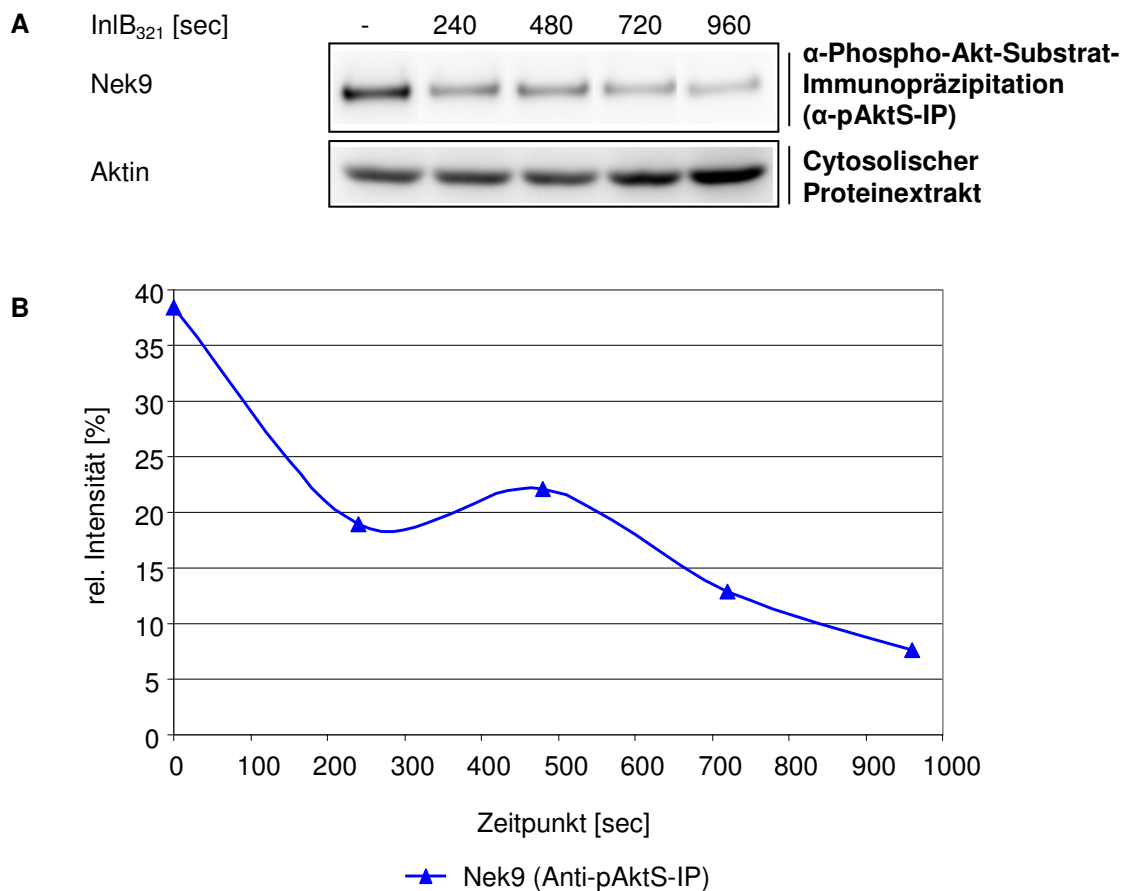


Abb. III.44: Abnahme des Nek9-Signals in der AGC-Kinase-Motif-spezifischen Immunopräzipitation. (A) Nach Stimulation mit InIB₃₂₁ über einen Zeitraum von 16 Minuten wurden cytosolische Extrakte Serum-frei konditionierter HeLa S3-Zellen hergestellt. Nach Immunopräzipitation mit dem Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrat Antikörper (pAktS-Antikörper) wurde im Westernblot die Signalstärke von Nek9 mit einem α -Nek9-pAB detektiert. (B) Nach Normierung auf zelluläres Aktin konnte eine InIB₃₂₁-abhängige deutliche Abnahme über ca. 35% in der Nek9-Signalstärke beobachtet werden.

Eine Dephosphorylierung von Threonin T³³³ nach InIB₃₂₁-Stimulation als Ursache für die zeitabhängige Reduktion der Nek9-Anreicherung mit dem Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrat Antikörper erscheint allerdings unwahrscheinlich. In Kapitel III.3.B (Phosphokinom-Studien) wurde gezeigt, dass Threonin T³³³ von Nek9 nach

vierminütiger InIB₃₂₁-Stimulation stark hochreguliert war im Vergleich zum nicht-induzierten Kontroll-Ansatz. Die im Westernblot (Abb. III.44) dargestellte Abnahme des Nek9-Signals deutet wiederum vielmehr auf eine Translokation von spezifisch Threonin T³³³-phosphoryliertem Nek9 hin. Eine weitere mögliche Ursache wäre eine verminderte Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrat Antikörper-Zugänglichkeit durch strukturelle Änderungen im nativen Nek9. Aufgrund der erst nach Liganden-Behandlung beobachteten erhöhten Phosphorylierung von Threonin T³³³ in den Phosphokinom-Studien hätte man in Westernblot-Analysen nach einer Immunopräzipitation mit dem Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrat Antikörper im Kontrollansatz keine Nek9-Anreicherung erwartet. Bei einem Vergleich der iTRAQTM-Reporterintensitäten der unbehandelten Kontrollen zeigte sich allerdings, dass auch in diesen Ansätzen das Peptid SS^pT³³³VTEAPIAVVTSR stets identifiziert wurde (Tab. III.16). Somit kann die Annahme getroffen werden, dass zumindest ein Anteil der zellulären Nek9-Kinase eine basale Phosphorylierung an Threonin T³³³ trägt und auch in der Immunopräzipitation ohne Induktion der c-Met-Signalkaskade angereichert werden kann.

Tab. III.16: iTRAQTM-Reporter-Intensitäten des Nek9-Peptides SS^pT³³³VTEAPIAVVTSR aus allen fünf quantitativen Phosphokinom-Studien.

Kontroll-Ansatz (PBS oder InIB ₃₂₁ /StreptIIIC LoF)	Induktions-Ansatz (InIB ₃₂₁ , InIB ₃₂₁ /StreptIIIC WT oder HGF)
Ionenintensität [counts]	Ionenintensität [counts]
15.01	151.4
315.36	1879.13
15.01	53.28
217.71	508.45
81.12	812.53

C. Untersuchung zur PI3- und MAP-Kinase-Abhängigkeit der Threonin T³³³-Phosphorylierung von Nek9

Die zeitliche Dynamik der von c-Met kontrollierten Signalwege der MAP-Kinase-Kaskade und der PI3K/Akt1(PKB)-Kinase-Kaskade wurde in dieser Arbeit ausführlich untersucht. Nach vierminütiger InIB₃₂₁-Stimulation ist die Aktivität der Kinasen Mek1/2, Erk1/2 und der PI3K-abhängigen Kinase Akt1(PKB) bereits stark angestiegen (Abb. III.18). Da die MAP-Kinase- und die PI3K/Akt1(PKB)-Kinase-vermittelte Signalweiterleitung fundamental für die *listerielle* Invasion und für physiologische c-Met-gesteuerte Prozesse ist, wurde in weiteren Experimenten eine

mögliche Zuordnung der Threonin T³³³-Phosphorylierung an Nek9 zu einem dieser beiden Signalwege untersucht. Zu diesem Zweck wurden die beiden Kinase-Inhibitoren U0126 und LY294002 eingesetzt. U0126 inhibiert die Mek-Kinase vermittelte Aktivierung der Erk1/2-Kinasen, während LY294002 die katalytische Aktivität der PI3-Kinase blockiert (Davies et al., 2000), wodurch die zur Akt1(PKB)-Aktivierung essentielle Rekrutierung dieser Kinase an die Plasmamembran unterbunden wird. Für beide Inhibitoren wurde zunächst die Dosis-abhängige inhibitorische Wirkung in HeLa S3-Zellen untersucht. Serum-frei konditionierte Zellen wurden für zwei Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors vorinkubiert und anschließend mit 10nM InlB₃₂₁ für vier Minuten behandelt. Während die Vorinkubation mit LY294002 keinen Einfluss auf die Aktivierung von c-Met und die Kinasen Erk1 und Erk2 ausübte, konnte die Aktivierung der Akt1(PKB)-Kinase wie erwartet deutlich unterdrückt werden (Abb. III.45). Bei einer Konzentration von 10µM LY294002 war die Aktivierung von Akt1(PKB) nahezu nicht mehr detektierbar und ab einer Vorbehandlung mit 100µM LY294002 konnte kein pS⁴⁷³-Signal mehr detektiert werden.

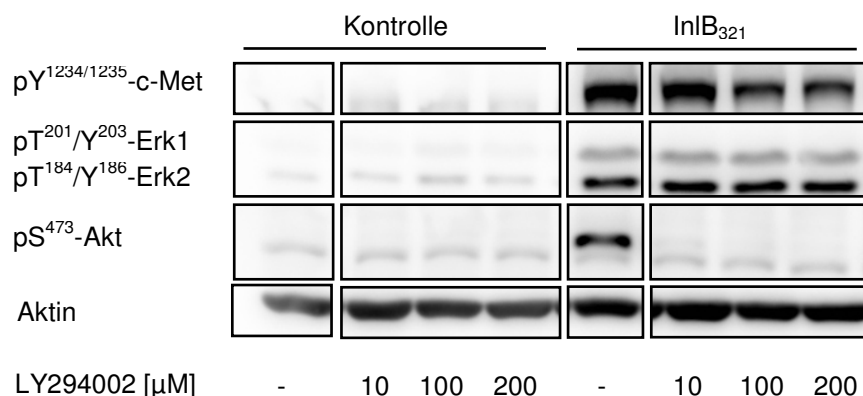


Abb. III.45: Dosis-abhängige Inhibierung der Akt1(PKB)-Kinase im InlB₃₂₁-stimulierten c-Met-Signalweg. HeLa S3-Zellen wurden in Serum-freiem Medium konditioniert, mit verschiedenen Konzentration des PI3K-Inhibitors LY294002 vorbehandelt und anschließend für vier Minuten mit 10nM InlB₃₂₁ inkubiert. Während die Aktivierung von c-Met und der Kinasen Erk1 und Erk2 nicht beeinflusst war, wurde bei einer Vorbehandlung mit 100µM LY294002 die c-Met-abhängige Aktivierung von Akt1(PKB) völlig unterbunden. Die Inhibitor-freien Ansätze wurden mit DMSO (LY24002-Lösemittel) vorbehandelt.

Zur Inhibierung der InlB₃₂₁-c-Met-vermittelten Aktivierung der MAP-Kinasen Mek1 und Mek2 wurden die U0126-Konzentrationen 10, 50 und 100µM eingesetzt. Nach zweistündiger Vorbehandlung und anschließender Induktion mit 10nM InlB₃₂₁ für vier Minuten konnte eine vollständige Blockierung der Mek1/2-katalysierten

Phosphorylierung der [TEY]-Motife in der Kinase-Domäne von Erk1 und Erk2 bereits bei 10 μ M U0126 erreicht werden. Ein Einfluss auf die Aktivierung von c-Met und Akt1(PKB) konnte nicht festgestellt werden (Abb. III.46).

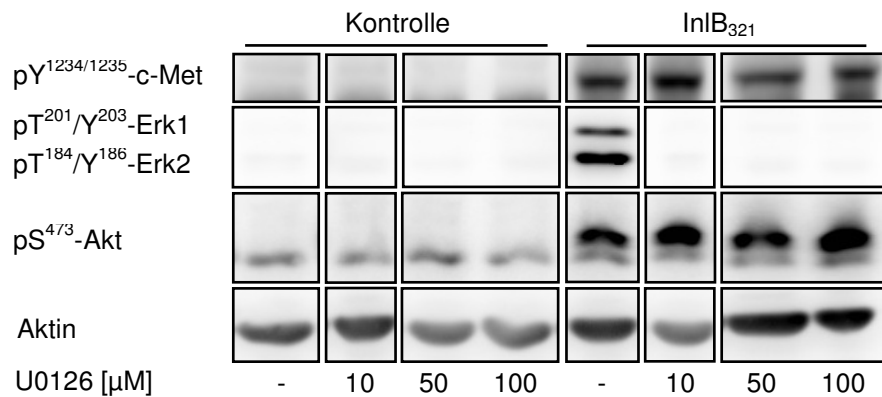


Abb. III.46: Dosis-abhängige Inhibierung der Mek1/2-Kinasen im InIB₃₂₁-stimulierten c-Met-Signalweg. HeLa S3-Zellen wurden in Serum-freiem Medium konditioniert, mit verschiedenen Konzentration des Mek1/2-Inhibitors U0126 vorbehandelt und anschließend für vier Minuten mit 10nM InIB₃₂₁ inkubiert. Während die Aktivierung von c-Met und Akt1(PKB) nicht beeinflusst war, wurde bei einer Vorbehandlung mit 10 μ M U0126 die Mek1/2-abhängige Aktivierung der Erk-Kinasen völlig unterbunden. Die Inhibitor-freien Ansätze wurden mit DMSO, dem U0126-Lösemittel, vorbehandelt.

Zur Charakterisierung einer möglichen MAPK- oder PI3K-Abhängigkeit der Threonin T³³³-Phosphorylierung von Nek9 wurden U0126 mit einer Konzentration von 20 μ M und LY294002 mit einer Konzentrationen von 100 μ M eingesetzt. Für jeden der beiden Inhibitoren wurde ein analoges Experiment nach Abb. III.47 durchgeführt: vier Ansätze mit semikonfluenten HeLa S3-Zellen wurden in Serum-freiem Medium konditioniert. Zwei der vier Schalen wurden mit dem jeweiligen Inhibitor und die anderen beiden Schalen mit derselben Menge an DMSO vorbehandelt. Anschließend erfolgte jeweils eine Induktion einer Inhibitor- und einer Lösemittel-vorbehandelten Schale mit 10nM InIB₃₂₁ für vier Minuten, die anderen beiden Schalen wurden nicht induziert und dienten als Kontrolle. Um Auswirkungen einer möglichen InIB₃₂₁-abhängigen Relokalisation von Nek9 in Igepal-unlösliche Zell-Kompartimente auf die Anreicherungs-Effizienz auszuschließen, wurden Gesamt-Zellextrakte durch Lyse der Zellen mit Triton X-100-Hochsalzpuffer unter Ultraschall-Behandlung nach dem Protokoll der quantitativen Phosphokinom-Studien durchgeführt. Nach Entnahme einer Probe aus jedem Ansatz für Westernblot-Analysen erfolgte die Immunopräzipitation über einen polyklonalen α -Nek9-Antikörper. Die präzipitierten Proteine der vier Ansätze wurden durch Zugabe von

Trypsin verdaut, über RP-Chromatographie gereinigt und jeder Ansatz mit einem der vier iTRAQ™-Reagenzien markiert. Nach Vereinen der vier Proben aus einem Inhibitor-Experiment wurden phosphorylierte Peptide über Ga^{3+} -IMAC angereichert. Die Peptide der IMAC-Durchlauf- und Waschfraktion wurden über eine Kationenaustausch-Chromatographie vorgereinigt und über HPLC-nESI-MS/MS analysiert. Die IMAC-Eluatfraktion wurde direkt über HPLC-nESI-MS/MS untersucht.

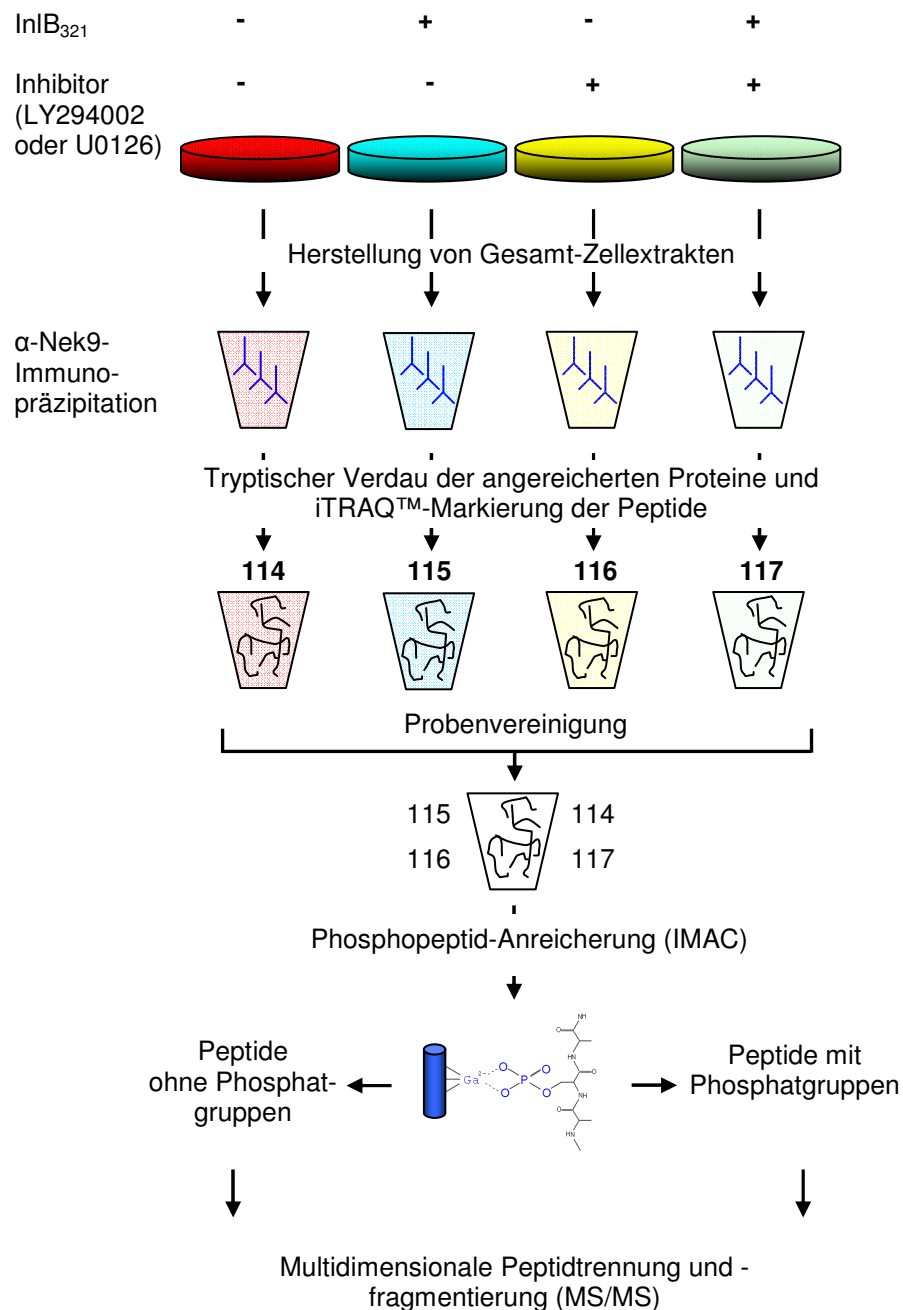


Abb. III.47: Experimentelle Strategie zur Charakterisierung des Einflusses der MAP-Kinase- und der PI3-Kinase-Signalübertragung auf die Phosphorylierung von Threonin T³³³ der Kinase Nek9.

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse nach LY294002-Behandlung sind in Abb. III.48 dargestellt.

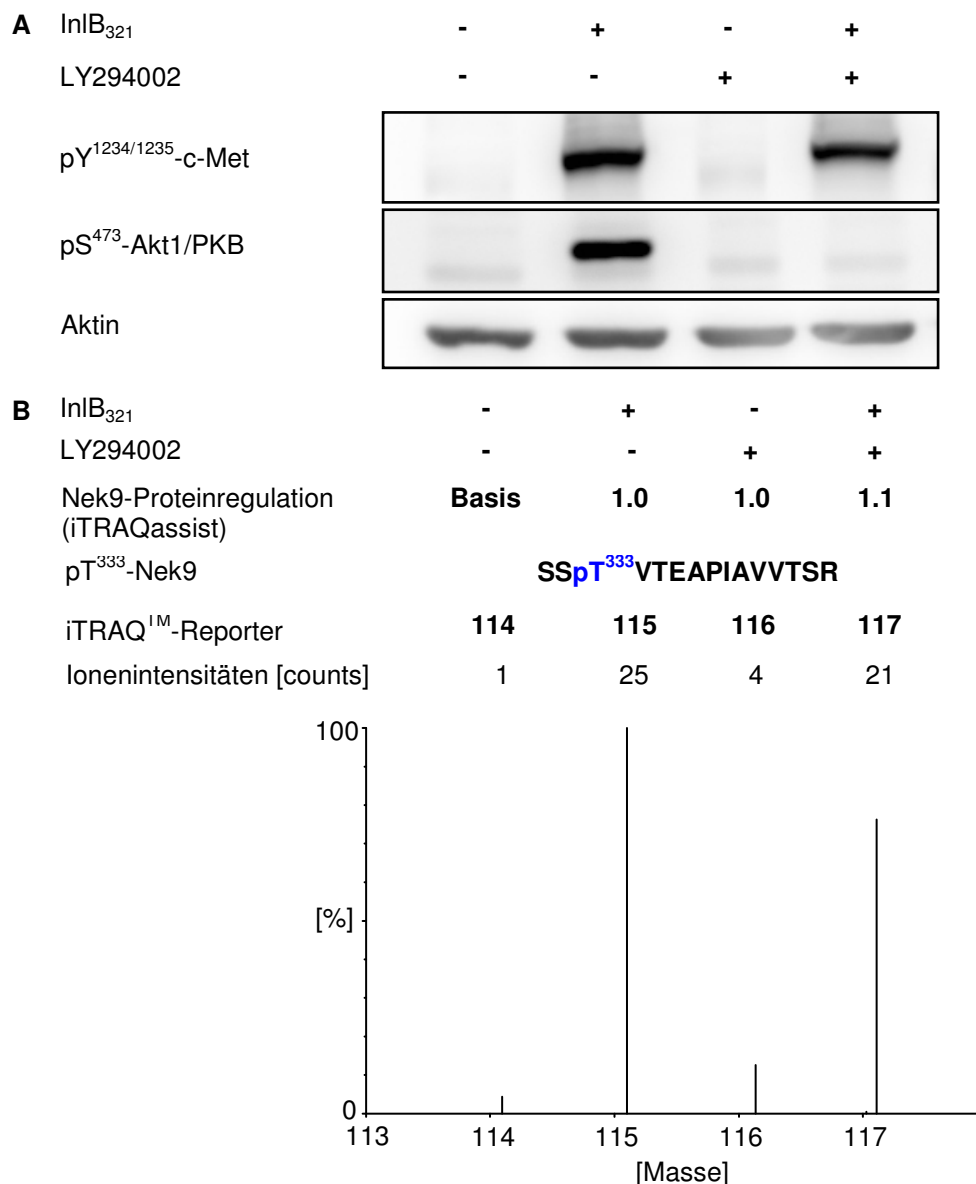


Abb. III.48: Der Einfluss der Inhibierung der PI3-Kinase auf die Threonin T³³³-Phosphorylierung von Nek9. (A) Serum-frei konditionierte HeLa S3-Zellen wurden mit 100µM LY294002 oder Lösemittel vorbehandelt und mit InIB₃₂₁ (10nM, vier Minuten) stimuliert. Die Aktivierung von Akt1(PKB) ist vollständig blockiert, die c-Met-Aktivierung ist unbeeinflusst. (B) Nach Anreicherung von Nek9, Verdau und iTRAQTM-Markierung wurden die vier Ansätze vereint und phosphorylierte Peptide von nicht-phosphorylierten Peptiden separiert (IMAC). Nach HPLC-nESI-MS/MS-Analyse erschien der iTRAQassist-kalkulierte Protein-Regulationsfaktor über alle nicht-phosphorylierten Peptide von Nek9 in allen Ansätzen mit einem Wert von 1.0 oder 1.1. Nek9 wurde somit in allen Ansätzen gleich effizient angereichert. Das phosphorylierte Peptid SSpT³³³VTEAPIAVVTSR wurde durch einen Datenbank-Abgleich mit SwissProt identifiziert. Die Ionen-Intensitäten der iTRAQTM-Reporter lässt erkennen, dass die Blockierung der PI3-Kinase keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Threonin T³³³ besitzt und eine ähnliche Signalstärke zeigt wie in der Stimulation ohne LY294002.

Die Vorbehandlung der Zellen mit LY294002 unterdrückte die Aktivierung der Akt1(PKB)-Kinase vollständig, die Aktivierung von c-Met war unbeeinflusst (Abb. III.48A). Die iTRAQassist-basierte Regulationsanalyse aller identifizierten nicht-phosphorylierten Nek9-Peptide zeigte, dass Nek9 in allen vier Ansätzen gleichermaßen angereichert wurde und nicht reguliert erschien. Der nicht-induzierte und mit Lösemittel vorbehandelte Ansatz diente dabei als Regulationsbasis (Reporter 114). Die darauf bezogenen Nek9-Regulationen des InIB₃₂₁-induzierten und mit Lösemittel behandelten Ansatzes (Reporter 115) und des LY294002-vorbehandelten nicht-induzierten Ansatzes (Reporter 116) zeigten maximal wahrscheinliche Regulationswerte von 1.0, der des InIB₃₂₁-induzierten und mit LY294002-behandelte Ansatz einen Wert von 1.1 (Reporter 117). Aus dem Rohspektrum des phosphorylierten Nek9-Peptides SS**P**^{T333}VTEAPIAVVTSR wurden die iTRAQTM-Reporterintensitäten ausgelesen. Die vierminütige Induktion zeigte eine wie bereits in den quantitativen Phosphokinom-Analysen ermittelte Hochregulation in den Ansätzen ohne Inhibitor-Vorbehandlung (Reporter 114 und 115). Die Behandlung der Zellen mit LY294002 resultierte in einem ähnlichen Verhältnis der Reporterintensitäten zwischen Kontroll-(Reporter 116) und Stimulations-(Reporter 117) Ansatz. Aus diesem Ergebnis kann eine erste Annahme darüber getroffen werden, dass Threonin T³³³ nicht durch PI3-Kinase-abhängige Kinasen phosphoryliert wird.

Die iTRAQTM-Analyse des korrespondierenden Ansatzes nach Vorbehandlung der Zellen mit dem MAP-Kinase-Inhibitor U0126 ist in Abb. III.49 gezeigt. Während die Inkubation mit U0126 bzw. mit DMSO keinen Einfluss auf die c-Met-Aktivierung hatte, konnte die Aktivität der Erk-Kinasen nach Stimulation der c-Met-Kaskade vollständig blockiert werden (Abb. III.49A). Die aus den nicht-phosphorylierten Peptiden kalkultierten iTRAQassist-Regulationswerte für Nek9 resultierten in Werten von 0.7 (U0126-frei, InIB₃₂₁-induziert, Reporter 115), 1.4 (U0126-behandelt, nicht induziert, Reporter 116) und 1.1 (U0126-behandelt, InIB₃₂₁-induziert, Reporter 117). Nek9 wurde somit in allen vier Ansätzen annähernd gleich angereichert. Die aus dem Rohspektrum des Nek9-Peptides SS**P**^{T333}VTEAPIAVVTSR ausgelesenen Reporter-Intensitäten zeigten erneut eine Hochregulation im InIB₃₂₁-stimulierten Ansatz (Reporter 115) im Vergleich zur Kontrolle (Reporter 114) in den mit DMSO behandelten Zellen. In den mit U0126 vorbehandelten Zellen erschien das Reporter-Signal des InIB₃₂₁-behandelten Ansatzes (Reporter 117) mit einer Ionenintensität, die tendenziell den Reporter-Intensitäten der nicht-stimulierten Ansätze (Reporter 115 und 116) ähnelte. Im Vergleich zur Inhibierung der PI3-Kinase durch LY294002-Behandlung (Abb. III.48) ist die Phosphorylierung von Threonin T³³³ nach U0126-Behandlung und InIB₃₂₁-Stimulation deutlich blockiert, was auf eine MAP-Kinase-abhängige Threonin T³³³-Phosphorylierung hindeutet.

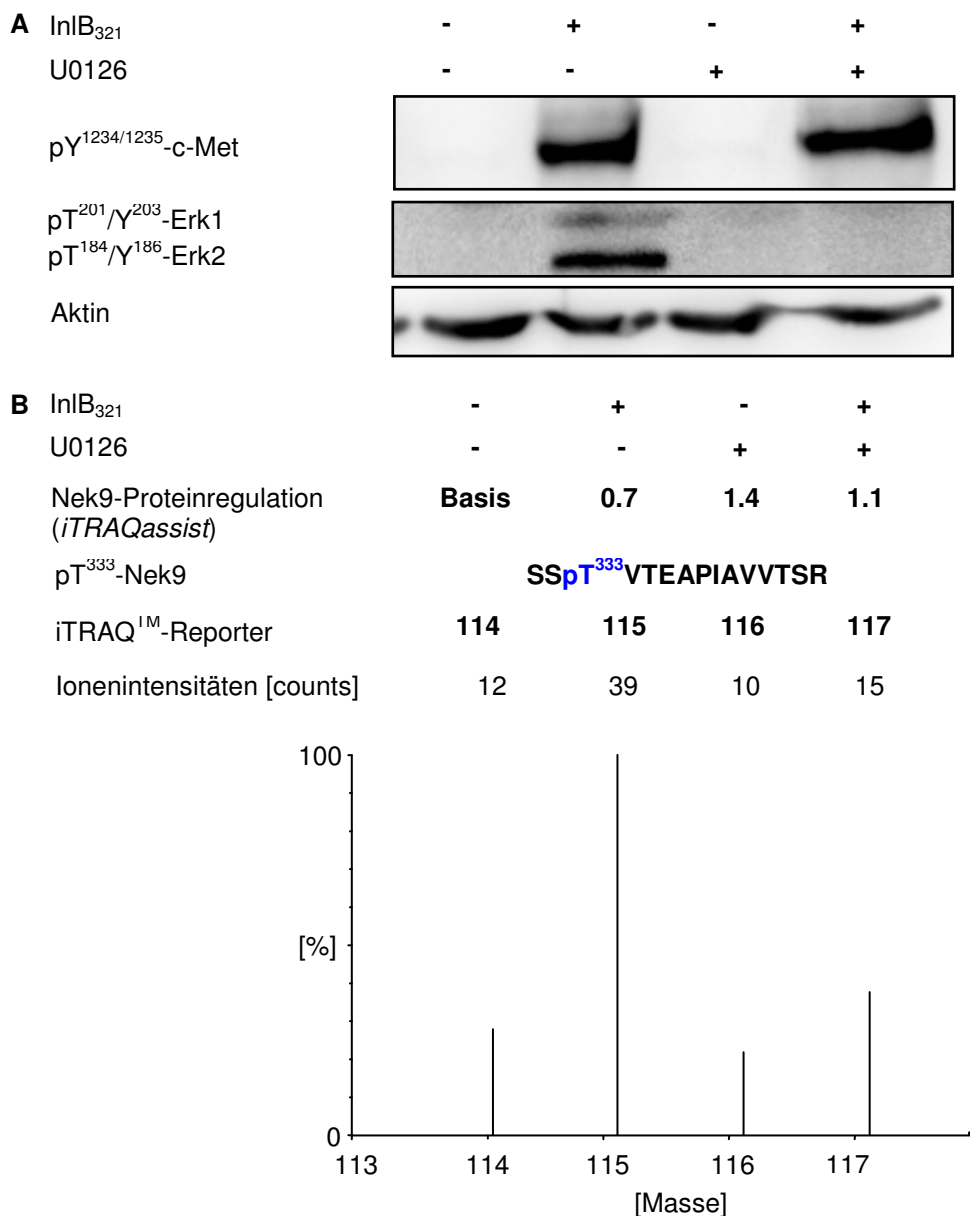


Abb. III.49: Der Einfluss der Mek1/2-Inhibierung auf die Threonin T³³³-Phosphorylierung von Nek9. (A) Serum-frei konditionierte HeLa S3-Zellen wurden mit 20µM U0126 oder Lösemittel vorbehandelt und mit InIB₃₂₁ (10nM, vier Minuten) stimuliert. Die Aktivierung der Erk-Kinasen ist vollständig blockiert, die c-Met-Aktivierung ist unbeeinflusst. (B) Nach Anreicherung von Nek9, Verdau und iTRAQTM-Markierung wurden die vier Ansätze vereint und phosphorylierte Peptide von nicht-phosphorylierten Peptiden separiert (IMAC). Nach HPLC-nESI-MS/MS-Analyse erschien der iTRAQassist-kalkulierte Protein-Regulationsfaktor über alle nicht-phosphorylierten Peptide von Nek9 in allen Ansätzen mit Werten zwischen 0.7 und 1.4. Nek9 wurde somit in allen Ansätzen in ähnlichen Mengen angereichert. Die Ionen-Intensitäten der iTRAQTM-Reporter des phosphorylierten Peptides SSpT³³³VTEAPIAVVTSR lässt erkennen, dass die U0126-Blockierung der Mek-Kinasen in einer Verminderung der Reporter-Intensität im induzierten und inhibierten Ansatz resultiert (Reporter 117) im Vergleich zum nicht-inhibierten induzierten Ansatz (Reporter 115) und eine ähnliche Ionenintensität zeigt wie die beiden Kontrollansätze (Reporter 114 und 116).

IV Diskussion

1. Posttranslationale Modifikations-Analysen am humanen Kinom

Durch die Phosphorylierung von Substratproteinen sind Kinasen an der Regulation nahezu aller biologischer Prozesse beteiligt, weshalb diese Proteinfamilie zu einer der informationsreichsten Proteinfamilien eines Organismus zählt (Manning et al., 2002). Kinasen selbst werden ebenfalls durch posttranslationale Modifikation gesteuert und eine Aktivierung korreliert in allen bekannten Fällen mit einer Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife der katalytischen Domäne. Aufgrund ihrer Schlüssel-Stellung in der Signaltransduktion ist eine Fehlregulation von Kinasen meist die pathologische Ursache von inflammatorischen Erkrankungen oder der Transformation von gesundem zu karzinogenem Gewebe. Darüber hinaus haben pathogene Keime Mechanismen entwickelt, über die sie durch die Beeinflussung von Kinasen des Wirtes zelluläre Prozesse zu ihrem Vorteil modulieren. Der Analyse posttranslatiionaler Modifikationen an Kinasen in einem pathologischen Zusammenhang kommt somit eine besondere Bedeutung zu. Da Kinasen zu den niedrig-exprimierten Signalproteinen zählen, erfordert deren biochemische Charakterisierung in der Regel eine Anreicherung. Typischerweise werden hierfür Antikörper-basierte Affinitätsmatrices eingesetzt oder es erfolgt eine Vorfraktionierung über Phosphotyrosin-spezifische Antikörper (Boeri et al., 2005; Anjum et al., 2005; Ballif et al., 2005; Blagoev et al., 2004). Das humane Genom kodiert allerdings über 500 Kinasen (Manning et al., 2002), weshalb klassische Ansätze aufgrund der Antikörper-Spezifität limitiert sind. Um diese Limitierung zu umgehen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine unselektive Kinase-Affinitätsmatrix zur Proteom-weiten Anreicherung als Voraussetzung für deren biochemische Charakterisierung validiert.

A. Die Kinase-selektive Affinitätsmatrix V16743 als funktionelle Basis der biochemischen Charakterisierung von Kinasen

Ein universelles Strukturmerkmal aller Kinasen ist die ATP-Bindungstasche, weshalb der Einsatz eines ATP-kompetitiven chemischen Bindungsliganden als ideal geeignet zur Herstellung einer Affinitätsmatrix erschien. Somit fiel die Wahl der in dieser Arbeit eingesetzten chemischen Sonde auf die Molekülklasse der niedermolekularen Kinase-Inhibitoren. Als nicht-hydrolysierbare ATP-Analoga inserieren diese Substanzen in die ATP-Bindungstasche von Kinasen und unterbinden dadurch deren

katalytische Aktivität (Mikalsen et al., 2006). Ein Einsatz dieser Molekülklasse in der Affinitäts-Chromatographie wurde erstmals 1985 zur Anreicherung der Kinasen PKC, PKA und PKG gezeigt (Inagaki et al., 1985). Allerdings befähigt erst die Kombination einer solchen Anreicherungs-Strategie mit der Sensitivität der massenspektrometrischen Proteinidentifizierung einen Einsatz in der systematischen Analyse von Kinasen (Daub et al., 2004). Der in dieser Arbeit eingesetzte immobilisierte Inhibitor V16743 wurde aus der Struktur des Pyrido[2,3-d]-Pyrimidin-Inhibitors PP58 abgeleitet, der ursprünglich zur selektiven Blockierung der Tyrosinkinasen PDGFR, FGFR, EGFR und c-Src synthetisiert wurde (Klutchko et al., 1998). PP58 erwies sich allerdings als weitaus weniger spezifisch: eine PP58-Affinitätsmatrix resultierte in der Anreicherung von 85 Kinasen und unter den PP58-Substratproteinen konnten neben Tyrosin- auch mehrere Serin/Threonin-Kinasen identifiziert werden (Wissing et al., 2007; Wissing et al., 2004). Aufgrund der bereits validierten Möglichkeit zur Immobilisierung (Wissing et al., 2004; Nagar et al., 2002) und des breiten Kinasen-Spektrums erwies sich PP58 somit als geeignete Basis für den in dieser Arbeit eingesetzten Inhibitor V16743.

Allerdings stellte sich die Frage, ob durch gezielten Eingriff in die Molekülstruktur von PP58 das Kinase-Spektrum erweitert werden konnte. Eine Antwort hierauf ergab sich aus Struktur-Analysen des in der CML-Therapie eingesetzten BCR-Abl-Kinase-Inhibitors STI571 mit einer Inhibitor-resistenten BCR-Abl-Variante. Eine in STI571-resistenten Patienten analysierte Mutation des polaren Threonins T³¹⁵ zum großvolumigen unpolaren Isoleucin verhindert eine Inserierung von STI571 in die ATP-Bindungstasche (Shah et al., 2002). Ein negativer Einfluss homologer Aminosäuren der Kinasen p38 und EGFR auf die selektive Blockierung durch niedermolekulare Substanzen unterstreicht deren strukturell kritische Position in der ATP-Bindungstasche (Blencke et al., 2003; Eysers et al., 1998). In der Tat konnte auch für die Substanz PP58 gezeigt werden, dass in der Kinase c-Src eine Mutation des zum Threonin T³¹⁵ der BCR-Abl-Kinase homologen Threonins T³⁴¹ zum großvolumigen Methionin eine Bindung verhindert. Strukturanalysen offenbarten, dass die Dichlorphenyl-Seitengruppe von PP58 nicht mehr in die ATP-Bindungstasche in der c-Src-T341M-Variante inserieren kann (Blencke et al., 2004). Der physikalischen Natur dieser aufgrund der Lage in der ATP-Bindungstasche als Gatekeeper (GK; Noble et al., 2004) bezeichneten Aminosäure kommt im Hinblick auf die inhibitorische Wirkung des Pyrido[2,3-d]-Pyrimidin-Inhibitors PP58 eine besondere Rolle zu. Kinasen mit großvolumigen Gatekeeper-Aminosäuren wie beispielsweise Methionin konnten zwar durch immobilisiertes PP58 angereichert werden, aufgrund der schwachen Affinität durch die sterische Interferenz war deren Ausbeute im Vergleich zu Kinasen mit kleinvolumigem GK allerdings sehr gering. Bestätigt wurde dies durch mikromolare IC₅₀-Werte für Kinasen mit großvolumigem

GK im Vergleich zum nano- bzw. subnanomolaren Bereich für Kinasen mit kleinvolumigem GK (Wissing et al., 2004). Da ca. 70% aller humanen Kinasen großvolumige GK-Aminosäuren wie Methionin, Leucin oder Phenylalanin tragen (Manning et al., 2002) und deren Anreicherung über PP58 somit zumindest limitiert ist, wurde für die vorliegende Arbeit PP58 konsequent auf die strukturelle Eigenart großvolumiger Gatekeeper-Aminosäuren hin angepasst. Durch die Entfernung der Dichlorphenyl-Seitengruppe entstand das Molekül V16743 (Abb. III.4). Der Einsatz dieser gezielt modifizierten Affinitätsmatrix in Gesamt-Zelllysaten von HeLa S3-Zellen in Kombination mit der HPLC-MS/MS-basierten Protein-Identifikation ermöglichte in dieser Arbeit die Anreicherung von 106 Kinasen. In der bisher umfassendsten PP58-Studie wurden aus den drei Zelllinien Jurkat, A549 und HCT-116 insgesamt 85 verschiedene Kinasen identifiziert (Wissing et al., 2007). In dieser Studie wurden ca. um den Faktor 10 mehr Zellen eingesetzt als in der vorliegenden Arbeit zur Anreicherung von Kinasen über die V16743-Matrix aus HeLa S3-Zellen. Trotz der geringeren Zellzahl übertraf V16743 das PP58-Substratspektrum mit einer nahezu 25% höheren Ausbeute an Kinasen deutlich. Hinzu kommt, dass die drei Zelllinien Jurkat, HCT-116 und A549 ein umfassenderes Kinaseprofil abdecken als die Zelllinie HeLa S3. Dies zeigt eindrucksvoll, dass die gezielte Entwicklung von V16743 in einem im Vergleich zur Ausgangsstruktur PP58 noch unspezifischeren Kinase-Inhibitor resultierte.

Unter den 106 V16743-affinen Kinasen wurden 97 als Protein-Kinasen identifiziert (Abb. III.10). Das V16743-Substratspektrum deckt somit in HeLa S3-Zellen 19% aller im humanen Genom kodierten Kinasen ab und stellt aktuell eine der unspezifischsten Affinitäts-Materialien zur Reinigung dieser Proteinklasse dar. Eine Sequenz-Analyse der in dieser Arbeit identifizierten Protein-Kinasen zeigte, dass die Entfernung der Dichlorphenyl-Gruppe von PP58 bei der Entwicklung von V16743 in der überwiegenden Anreicherung von Kinasen mit großvolumiger GK-Aminosäure wie Methionin (40 Kinasen), Leucin (12 Kinasen) und Phenylalanin (22 Kinasen) resultierte. Nur 16 Kinasen zeigten kleine hydrophile Aminosäuren wie Threonin oder Serin. Aus diesem Vergleich wird eine deutliche Präferenz des Inhibitors V16743 für Kinasen mit großem GK ersichtlich. Dies wird dadurch untermauert, dass über V16743 von allen im humanen Genom kodierten Kinasen mit großvolumiger GK-Aminosäure 22% angereichert und mit einem mittleren Protein-Score von 275 identifiziert wurden. Im Gegensatz hierzu wurden nur 13% der im Genom kodierten Kinasen mit kleinvolumiger GK-Aminosäure identifiziert, wobei der mittlere Proteinscore mit einem Wert von 215 ebenfalls niedriger ausfiel. Die Auswertung dieser Daten berücksichtigt zwar weder das Expressionsprofil für Kinasen in HeLa S3-Zellen noch analytische Einflüsse wie beispielsweise die Ionensuppression, allerdings wird deutlich, dass die Entfernung der Dichlorphenyl-Gruppe zwar in einer

optimierten Anreicherung von Kinasen mit großvolumigem GK resultierte, gleichzeitig aber ein Verlust in der Affinität zu Kinasen mit kleinem GK in Kauf genommen wurde. Um in zukünftigen Studien eine noch umfangreichere Abdeckung von humanen Kinasen zu erreichen, wäre eine Kombination von V16743 mit beispielsweise der Ausgangsstruktur PP58 eine erfolgversprechende Erweiterung der Affinitäts-chromatographischen Strategie.

Durch eine Einteilung der V16743-affinen Proteine nach Substrat (UniprotKB) und nach phylogenetischem Verwandtschaftsgrad (Manning et al., 2002) wurden die identifizierten Protein-Kinasen klassifiziert. V16743 reicherte insgesamt 77 Serin/Threonin-Kinasen, 16 Tyrosin-Kinasen und vier dualspezifische Kinasen an (Abb. III.9). Der überwiegende Anteil der angereicherten Kinasen sind lösliche Proteinkinasen, trotzdem konnten auch membranständige Kinasen wie die Rezeptor-Tyrosinkinasen DDR1 und DDR2, der Insulin-Rezeptor INSR, die Ephrin-Rezeptoren Eph4B und 2A und der HGF/SF-Rezeptor c-Met angereichert werden, welche nur in geringen Kopienzahlen in der Zelle vorkommen. Die Tyrosinkinasen EGFR, PDGFR, FGFR und c-Src, zu deren Inhibierung die Substanz PP58 ursprünglich entwickelt wurde, konnten mit V16743 nicht mehr angereichert werden. Neben der Inhibierung dieser Kinasen durch PP58 in *in-vitro*-Kinase-Assays (Klutchko et al., 1998) wurden c-Src und FGFR auch an immobilisiertem PP58 identifiziert (Wissing et al., 2007). Alle vier Tyrosinkinasen besitzen ein Threonin an der Gatekeeper-Position (Manning et al., 2002), wodurch erklärt werden könnte, warum diese Kinasen keine ausreichende Affinität zu V16743 ausbilden. Die Einteilung der identifizierten Kinasen in die phylogenetischen Gruppen zeigte, dass V16743 Kinasen aus acht der neun Gruppen bindet und somit eine äußerst unselektive Substanz darstellt. Eine Präferenz für V16743 zeigten die Kinasen der CMGC-Familie. Bezogen auf den Anteil im humanen Kinom wurden mit 61% bzw 25 Kinasen von dieser Familie die größte Abdeckung erreicht. Zu den Kinasen der CMGC-Familie zählen die Zellzyklus-Kinasen, die MAP-Kinasen, GSK3-Kinasen und die CLK-Kinasen. Die begünstigte Anreicherung der CMGC-Kinasen durch V16743 lässt sich wiederum durch die GK-Aminosäure erklären. Der Großteil der CMGC-Kinasen trägt das großvolumige Phenylalanin an dieser Position und mit 22 Kinasen bzw. 33% im Vergleich zum humanen Kinom wurden von den Phenylalanin-tragenden Kinasen die meisten angereichert. Die V16743-Affinitätsmatrix zeigt somit eine erhöhte Affinität zu Phenylalanin als Gatekeeper-Aminosäure und eignet sich besonders zur Reinigung von Kinasen der CMGC-Gruppe.

Neben Kinasen wurden über die V16743-Affinitätsmatrix Proteine angereichert, welche keine Kinase-Aktivität zeigen (Abb. III.12). Dazu zählen Nukleotid-bindende Proteine, die in vielen Affinitäts-chromatographischen Studien als zusätzliche

Zielproteine für Kinase-Inhibitoren identifiziert wurden (Daub et al., 2004). Ebenso wurden regulatorische Untereinheiten von Kinasen wie beispielsweise Cycline angereichert, bei denen eine Ko-Reinigung im Komplex mit der jeweiligen Kinase anzunehmen ist. Für die überwiegende Anzahl von identifizierten Proteinen ohne Kinase-Aktivität konnte aufgrund der funktionellen Heterogenität keine Klassifizierung durchgeführt werden. Da die Identifizierung dieser Proteine in den fünf unabhängigen Experimenten im Vergleich zur Identifizierung von Kinasen weitaus weniger reproduzierbar war (Tab. III.2), ist in vielen Fällen eine unselektive Interaktion mit der Inhibitor-Matrix wahrscheinlich. Nur wenige Proteine ohne Kinase-Aktivität wurden auffällig reproduzierbar in allen Experimenten und mit einem hohen Proteinscore signifikant identifiziert, was auf eine ausgeprägte Affinität zu V16743 hindeutet. Dazu zählen beispielsweise die Enzyme $\Delta(3,5)$ - $\Delta(2,4)$ -dienyl-CoA-Isomerase (ECH1) und die Dehydrogenase NQO2. ECH1 wurde bereits als vorrangiges Zielprotein eines p38 Kinase-Inhibitors identifiziert (Godl et al., 2003). Somit eröffnet der vorgestellte chromatographische Ansatz die Möglichkeit, neben Kinasen auch Proteine ohne Kinase-Aktivität für eine biochemische Charakterisierung anzureichern. Für klinisch relevante Substanzen bietet darüber hinaus die umfassende Identifizierung von Substrat-Proteinen eines Inhibitors eine Möglichkeit zur rechtzeitigen Klärung von potentiellen Nebeneffekten an.

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse der Kinase-Affinitäts-Chromatographie, dass V16743 mit einem Substrat-Spektrum von über 100 Kinasen aus nahezu allen bekannten Gruppen eine ideale Grundlage zur biochemischen Charakterisierung von Proteinen dieser Enzymfamilie darstellt. Eine vollständige Identifizierung aller humaner Kinasen durch eine einzige Affinitätsmatrix in einer Zelllinie ist nicht möglich, da (i) von den über 500 im humanen Genom kodierten Kinasen jeweils nur ein Anteil Zelltyp-abhängig exprimiert wird, (ii) Zelltyp-spezifische Isoformen oder Splice-Varianten von Kinasen nicht vollständig in Datenbanken wie SwissProt erfasst sind und somit massenspektrometrisch nicht identifiziert werden können und (iii) die individuellen strukturellen Merkmale der ATP-Bindungstasche von Kinasen die Affinität zu einem Inhibitor beeinflussen. Ein möglicher Proteinkomplex zwischen Kinase und Substrat oder regulatorischer Einheit kann zusätzlich eine Inserierung des Kinase-Inhibitors verhindern. Zwar wurden für die experimentellen Ansätze Lysis-Bedingungen gewählt, welche die vollständige Solubilisierung von Proteinkomplexen förderte, allerdings konnten regulatorische Untereinheiten von Kinasen identifiziert werden, was zeigt, dass auch Proteinkomplexe unter gegebenen Bedingungen vorlagen. Einen zusätzlichen Einfluss auf die Zugänglichkeit zu einem Inhibitor-Molekül besitzt die Konformation einer Kinase, die möglicherweise je nach Aktivitäts-Status in einer offenen oder verdeckten ATP-Bindungstasche resultiert. Die im späteren Kapitel diskutierte

massenspektrometrische Quantifizierung eröffnet eine Analyse der Zugänglichkeit eines Inhibitors zur ATP-Bindungstasche in Abhängigkeit des Aktivitäts-Status, woraus Rückschlüsse auf Aktivitäts-abhängige konformationelle Änderungen möglich werden. Kinasen der Erk-Familie beispielsweise konnten unabhängig von deren Aktivität in gleichem Maße angereichert werden (Abb. III.23A). Hieraus lässt sich schließen, dass zumindest bei dieser Kinase-Familie Änderungen im Aktivitäts-Status nicht primär durch die Zugänglichkeit des ATP-Bindungsbereichs gesteuert werden.

B. Quantitative Studien von Phosphorylierungen an V16743-Substraten

Mit der Etablierung der Kinase-selektiven Affinitätsmatrix V16743 wurde in der vorliegenden Arbeit die Voraussetzung für eine biochemische Analyse dieser Enzymklasse geschaffen. Die Identifizierung von Kinasen, welche eine potentielle Rolle in der aktivierten c-Met-Signalkaskade übernehmen, erfolgte durch die quantitative Analyse von Phosphorylierungs-Ereignissen an dieser Proteinfamilie. Bereits etablierte Methoden wie beispielsweise die Trennung in der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2DE) in Kombination mit einer Phosphat-spezifischen Anfärbung (Reinders und Sickmann, 2005) kommen hierfür nicht in Frage. Die Limitierungen der 2DE verhindern eine Trennung von Proteinen mit extremen pI-Werten sowie von hydrophoben Membran-Proteinen. Eine Phosphat-spezifische Protein-Färbung nach 2DE-Trennung ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung von phosphorylierten Proteinen und wurde erfolgreich zur Identifizierung differentiell modifizierter Proteine in HeLa S3-Zellen nach HGF/SF- bzw. InlB-Stimulation eingesetzt (Reinl, 2004). Die exakte Zuordnung der Phosphorylierungs-Stelle durch Peptidsequenzierung, wodurch überhaupt erst eine Aussage über eine Funktion der Phosphorylierung möglich wird, ist durch dieses Verfahren allerdings kaum realisierbar.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die gelfreie massenspektrometrische Peptidsequenzierung eingesetzt, die die Limitierungen der 2DE elegant umgeht und momentan die Methode der Wahl zur systematischen Analyse von Phosphorylierungs-Stellen in komplexen Proben darstellt. Aufgrund des Ungleichgewichts zwischen phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Peptiden in einem tryptischen Verdau zu Gunsten der nicht-phosphorylierten Peptide wäre die Identifizierung von Phosphorylierungs-Stellen selbst in einem Subproteom wenig aussichtsreich. Neben dem stöchiometrischen Einfluss erschweren zusätzliche Effekte wie beispielsweise die Ionensuppression die Sequenzierung phosphorylierter Peptide (Mann et al., 2002). Erst durch eine Isolierung der phosphorylierten Peptide war eine systematische Modifikations-Analyse möglich. Das hierfür gewählte

Affinitätsverfahren beruht auf der spezifischen Interaktion von Phosphatresten mit immobilisierten Ga^{3+} -Ionen (Ga^{3+} -IMAC) und konnte erfolgreich zur Identifizierung von 231 nicht-redundanten Phosphorylierungs-Stellen an V16743-affinen Proteinen eingesetzt werden. Die optimierte Elution von mit Ga^{3+} -interagierenden Peptiden erfolgte unter spezifischen Bedingungen mit einem Phosphat-haltigen Puffer. Hiermit wurde erreicht, dass im IMAC-Eluat durchschnittlich 82% der sequenzierten Peptide eine oder mehrere Phosphatgruppen trugen. Nur 18% der Peptide trugen keine Phosphorylierung und deren Anreicherung beruhte auf der Interaktion saurer Aminosäure-Seitenketten zu Ga^{3+} (Haydon et al., 2003; Stensballe et al., 2001). Die Anreicherung saurer Peptide über das IMAC-Verfahren kann zwar durch eine Veresterung der Carboxylgruppe vermieden werden (Haydon et al., 2003; Ficarro et al., 2002), allerdings geht diese Reaktion in der Regel mit einem hohen Probenverlust einher. Aufgrund der erreichten Anreicherungs-Effizienz von 82% wurde deshalb auf eine weitere Optimierung des IMAC-Verfahrens durch eine Veresterung verzichtet.

Von den insgesamt 446 identifizierten V16743-affinen Proteinen wurden 24% zu Kinasen und 76% zu Proteinen ohne Kinase-Aktivität zugeordnet (Abb. III.7). Im Gegensatz hierzu zeigte sich, dass von insgesamt 231 identifizierten Phosphorylierungs-Stellen der V16743-Substrat-Proteine 72% (166) von Kinasen und nur 28% von Proteinen ohne Kinase-Aktivität stammten (Abb. III.14). In einer im Jahr 2004 veröffentlichten Studie konnten von 2002 in einem Gesamt-Zellextrakt identifizierten Phosphorylierungs-Stellen nur 3% zu Kinasen zugeordnet werden (Beausoleil et al., 2004), woraus nochmals die Notwendigkeit aber auch die Effizienz der selektiven Anreicherung von Kinasen durch die V16743-Affinitäts-Matrix für deren biochemische Charakterisierung deutlich wird.

Eine Abschätzung von Aminosäure-spezifischen Phosphorylierungen in Vertebraten führte zu einer Verteilung von Phospho-Serin zu Phospho-Threonin zu Phospho-Tyrosin von 90:10:0.5 (Mann et al., 2002). Die Analyse der in dieser Arbeit identifizierten Phosphorylierungen zeigte für Proteine ohne Kinase-Aktivität ein Verhältnis von 84:14:2 und weicht nur geringfügig von dem für Vertebraten abgeschätzten Wert ab. Die Abweichung basiert höchstwahrscheinlich auf der geringen Anzahl von 64 identifizierten Phosphorylierungs-Stellen in Proteinen ohne Kinase-Aktivität. Für Kinasen selbst ergab sich interessanter Weise ein deutlich abweichendes Verhältnis von 66:28:6. Diese Abweichung zeigt, dass im Unterschied zu Substrat-Proteinen die Phosphorylierung von Threoninen und Tyrosinen an Kinasen ein gehäuftes Ereignis darstellt. Von den insgesamt 106 identifizierten Kinasen konnten darüber hinaus an 50% eine oder mehrere Phosphorylierungen identifiziert werden. Auch dieser Anteil weicht von der Schätzung ab, dass ca. 30%

aller Proteine eines eukaryotischen Proteoms transient phosphoryliert vorliegen (Zolnierowicz und Bollen, 2000). Hieraus wird ersichtlich, dass die Phosphorylierung aufgrund des gehäuftten Auftretens in der Enzymklasse der Kinasen eine besondere regulatorische Funktion einnimmt.

Die Kombination der Kinase-selektiven Affinitäts-Chromatographie mit der IMAC-basierten Anreicherung phosphorylierter Peptide führte zur Identifizierung sowohl bekannter als auch neuer Phosphorylierungs-Stellen an V16743-affinen Proteinen. 68 Phosphorylierungs-Stellen von Kinasen und 29 von Proteinen ohne Kinase-Aktivität sind aktuell in keiner der überprüften Datenbanken abgelegt. Dies demonstriert, dass trotz langjähriger Erforschung viele der *in-vivo* auftretenden Phosphorylierungs-Stellen bislang nicht bekannt sind. Die hier vorgestellte systematische Identifizierung posttranslationaler Modifikationen an Kinasen bietet deshalb eine Grundlage für Mutationsanalysen, um potentielle regulatorische Funktionen der Phosphorylierungen im Hinblick auf die Kontrolle der katalytischen Kinase-Aktivität zu evaluieren.

Die Identifizierung c-Met-abhängiger Kinasen wurde erst durch die Erhebung quantitativer Daten über die Signalstärke einer Phosphorylierung ermöglicht. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente erforderten eine vergleichende Analyse des Phosphorylierungs-Musters von Kinasen aus mit einem c-Met-Liganden behandelten Zellen zu einem nicht-stimulierten Kontroll-Ansatz. Die relative Quantifizierung sämtlicher Peptide wurde in dieser Arbeit durch Peptid-Markierung mit isobaren iTRAQ™-Reportern erreicht. Die Markierung erfolgte direkt nach dem tryptischen Verdau der V16743-Eluat eines Experimentes (siehe Abb. III.1), um durch eine schnelle Vereinigung beider Ansätze Pipettier-Fehler in der anschließenden Isolation phosphorylierter Peptide zu minimieren. Die Bestimmung der Reporter-Signalintensitäten während der Peptidfragmentierung erlaubte einen direkten Vergleich der Anwesenheit eines Peptides in stimulierten zu unbehandelten Zellen. In einem einzigen Experiment wurden somit mehrere 1000 MS/MS-Spektren von phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Peptiden aufgezeichnet, die quantitative Daten beinhalteten. Die manuelle Regulationsanalyse in solchen Datensätzen ist aufgrund der Komplexität nicht mehr möglich. Die Herausforderung der massenspektrometrischen Quantifizierung bestand somit in der automatisierten Datenanalyse, die sowohl eine Korrektur von voneinander abweichenden Ausgangs-Probenmengen durch Normalisierung über alle Datenpunkte sowie von Synthesefehlern der Reporter, den sog. Nebenprodukt-Anteilen, einkalkulieren sollte. Parallel zu der vorliegenden Arbeit wurde für diesen Zweck in der Arbeitsgruppe Zelluläre Proteomforschung (Dr. L. Jänsch) die Analyse-Software iTRAQassist entwickelt (Hundertmark C., Bioinformatics. In Vorbereitung). iTRAQassist kalkuliert

einen Regulationsfaktor für ein Protein aus den Einzelregulationsfaktoren aller nicht-phosphorylierten Peptide. Der Regulationsfaktor eines Phosphopeptides wird gesondert und im Vergleich zur Proteinregulation aufgeführt.

Auf diese Weise wurden nach Aktivierung der c-Met Signalkaskade insgesamt 13 einfach bzw. mehrfach phosphorylierte Peptide mit nicht-redundanten Phosphorylierungs-Stellen von Kinasen und vier von Proteinen ohne Kinase-Aktivität als reguliert identifiziert. Soweit es aufgrund der Verfügbarkeit eines spezifischen Antikörpers möglich war, konnten die regulierten Phosphorylierungen im Westernblot nach Aktivierung des c-Met Signalweges bestätigt werden, was die Aussagekraft der massenspektrometrischen Quantifizierung eindrucksvoll hervorhebt. Einen Widerspruch zwischen Westernblot-Analysen und massenspektrometrischer Quantifizierung gab es in keinem der untersuchten Fälle. Neben bereits zur c-Met Signalkaskade zugeordneten Kinasen wie Erk1, Erk2 (Birchmeier et al., 2003; Copp et al., 2003) oder GSK3B (Gong et al., 2005) konnten mit dem in dieser Arbeit etablierten Konzept der quantitativen Phosphokinom-Analyse Kinasen identifiziert werden, die bislang nicht in einem Zusammenhang zum c-Met Signalweg beschrieben sind. Dazu zählen beispielsweise die Kinasen RSK-2 oder Nek9. Darüber hinaus zeigte sich, dass neben der Regulation von Phosphorylierungen auch Proteine wie c-Met, Prohibitin oder die MAP-Kinase MP2K6 (MKK6) reguliert erschienen. Eine Regulation auf Proteinebene kann durch eine Änderung in der Affinität eines Proteins zur Inhibitor-Matrix oder durch Degradation erklärt werden. Proteine, die nicht direkt mit V16743 interagieren können, können durch Liganden-induzierte Stabilisierung oder Destabilisierung von Komplexen mit direkten V16743-Substraten eine Regulation zeigen. Da der Stimulations-Zeitraum in allen Experimenten mit vier Minuten sehr kurz gewählt war, wird Protein-Biosynthese als Grundlage für eine positive Regulation ausgeschlossen. Die erarbeiteten Daten bilden zukünftig eine Basis für weitergehende Studien mit Hinblick auf eine funktionelle Analyse in der c-Met-Signalkaskade während der InlB-vermittelten Invasion von *L. monocytogenes* und der HGF/SF-induzierten Signalübertragung. Somit zeigt der vorgestellte Ansatz, dass diese innovative Methode einen Beitrag zur Vervollständigung bereits intensiv untersuchter Signalwege wie der c-Met-Signalkaskade liefern und auf weitere pathologisch relevante Signalwege erfolgversprechend angewendet werden kann. Auf der Grundlage der hier gezeigten statischen Analyse eröffnet das Konzept der iTRAQ™-basierten Quantifizierung in Zukunft eine zeitaufgelöste Charakterisierung c-Met-abhängiger Modifikationen an Kinasen. iTRAQ™ ermöglicht inzwischen einen Vergleich von bis zu acht verschiedenen Zuständen (Pierce et al., 2007), wodurch eine hierarchische Erstellung eines Netzwerkes möglich wird. Eine potentielle Funktion der hier

identifizierten differentiellen posttranslationalen Modifikationen und Proteinregulationen wird in den nachfolgenden Kapiteln diskutiert.

Zwei Punkte sollen abschließend im Bezug auf die gezeigte massenspektrometrische Quantifizierung erwähnt werden: von insgesamt 231 als nicht-redundant identifizierten Phosphorylierungen wurden 17 nach Aktivierung der c-Met Signalkaskade als reguliert charakterisiert. Über 90% der posttranslational modifizierten Peptide waren nicht reguliert und wurden deshalb nicht im Kontext der c-Met-Signalkaskade ausgewertet. Diese Modifikationen können zusätzlich wertvolle Informationen über die Aktivität einer Kinase enthalten. Ist beispielsweise eine in der HGF/SF-stimulierten c-Met-Signalkaskade als reguliert beschriebene Phosphorylierungs-Stelle nach InIB-Aktivierung unverändert, kann dies als deutlicher Hinweis für Unterschiede in der Signaltransduktion durch beide Liganden interpretiert werden. Ebenso erlauben nicht-regulierte Phosphorylierungen im c-Met-Signalweg, welche bereits mit einer inhibitorischen oder einer aktivierenden Funktion veröffentlicht sind, eine Aussage über den katalytischen Zustand einer Kinase in der untersuchten Signalkaskade.

Darüber hinaus sind Regulationen an nicht-modifizierten Peptiden ebenfalls aussagekräftig, wie das hier dargestellte Beispiel demonstriert: das nicht-modifizierte Peptid VADPDHDHTGFLTEYVATR der Kinase Erk1 wurde sowohl nach HGF/SF- wie auch nach InIB₃₂₁-behandelten Zellen als stark reprimiert (Faktor 0.2) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollansätzen quantifiziert. Mit Ausnahme des hier gezeigten Peptids zeigt die Gesamtheit aller unmodifizierten Erk1-Peptide keinerlei Regulation zwischen Induktions- und Kontrollansatz. Im Gegensatz hierzu wurde dasselbe Peptid mit einer zweifachen Phosphorylierung im [TEY]-Motif in allen Stimulations-Ansätzen als deutlich hochreguliert (Faktoren 19 bis 40) identifiziert, wobei dieses Peptid aus der Aktivierungsschleife der Kinase stammt und deren Aktivitäts-Status repräsentiert. Diese gegenläufige Regulation eines Peptides in der modifizierten und der nicht-modifizierten Form zeigt, dass regulierte unmodifizierte Peptide Rückschlüsse über die Regulation einer möglicherweise modifizierten Peptidform zulassen, auch wenn dieses Peptid aufgrund der Probenkomplexität in der massenspektrometrischen Analyse nicht erfasst wurde.

Eine umfassende Auswertung von nicht-modifizierten aber regulierten Peptiden bzw. nicht-regulierten modifizierten Peptiden ist nach aktuellem Stand äußerst zeitaufwendig. Um einen möglichst umfassenden Informationsgehalt aus den durchgeführten Experimenten zu erzielen, ist eine weitere Optimierung der bioinformatischen Datenerfassung notwendig und erfordert eine Vernetzung von experimentellen Daten mit frei zugänglichen Datenbanken wie Pubmed, Phosphosite

oder der Strukturdatenbank PDB. Somit könnten bereits in der Literatur beschriebene funktionelle Studien zu Phosphorylierungen und eventuell vorhandene Strukturdaten in einem zeitlich begrenzten Rahmen mit experimentellen Daten abgeglichen werden und frühzeitig in die Planung weitergehender Experimente einfließen.

2. Kinasen in der InIB₃₂₁-stimulierten c-Met-Signalkaskade

A. Die N-terminale Variante InIB₃₂₁ ist ein wirkungsvoller Aktivator der c-Met-abhängigen PI3-Kinase- und MAP-Kinase-Signalwege

Über den Virulenzfaktor InIB aktiviert *L. monocytogenes* die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met, wodurch seine Aufnahme in nicht-phagozytierende Zellen induziert wird (Shen et al., 2000). Als essentiell für diesen Prozess wurde die c-Met-abhängige Aktivierung der PI3-Kinase (Ireton et al., 1999) und der MAP-Kinase-Kaskade (Copp et al., 2003) beschrieben und ein Einfluss der LIM-Kinase auf die Aufnahme InIB-beschichteter Latexkügelchen wurde gezeigt (Bierne et al., 2001). Bislang stand kein technologischer Ansatz zur Verfügung, der eine systematische biochemische Charakterisierung von Kinasen in Signaltransduktions-Prozessen erlaubt. Das erstmals in dieser Arbeit etablierte Konzept der quantitativen Phosphokinom-Analyse forcierte somit die Identifizierung von Kinasen, die aufgrund einer differentiellen Phosphorylierung dem InIB-stimulierten c-Met Signalweg zugeordnet werden können.

Die Identifizierung von differentiell phosphorylierten Kinasen im InIB-stimulierten c-Met-Signalweg erforderte allerdings zunächst die Ausarbeitung eines geeigneten Perturbations-Modells, welches (i) die funktionellen Eigenschaften des Liganden, (ii) eine geeignete Zelllinie und (iii) einen Stimulations-Zeitpunkt für die statische Phosphokinom-Analyse berücksichtigte. InIB besitzt als einziges Mitglied der Internalin-Familie als besonderes strukturelles Merkmal die C-terminal gelegenen GW-Module (Hamon et al., 2006). Über dieses Motif findet eine nicht-kovalente Verknüpfung zur Lipoteichonsäure der bakteriellen Zellwand statt (Jonquieres et al., 1999; Braun et al., 1997) und InIB kommt sowohl als Zellwand-gebundene wie auch in den Überstand sekretierte Form vor (Trost et al., 2005; Jonquieres et al., 1999). Lösliches InIB ist in der Lage, als funktionelles Signalmolekül eine Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts zu stimulieren (Ireton et al., 1999) und c-Met (Shen et al., 2000) sowie die PI3-Kinase (Ireton et al., 1999) und den MAP-Kinase-Signalweg (Copp et al., 2003) zu aktivieren. Für die Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met sind die N-terminale Internalin-Domäne (InIB₃₂₁) ausreichend (Niemann et al., 2007; Banerjee et al., 2004; Machner et al., 2003). Der C-Terminus von InIB bindet neben der bakteriellen Zellwand-Komponente Lipoteichonsäure das Oberflächenprotein

gC1q-R (Braun et al., 2000) wie auch Glykosaminoglykane (Banerjee et al., 2004; Jonquieres et al., 2001), wodurch eine Funktion als Signalmolekül des löslichen InlB hervorgehoben wird.

Um eine potentielle Induktion von Nebeneffekten durch den C-terminalen Anteil von InlB zu vermeiden wurde in dieser Arbeit die Variante InlB₃₂₁ als c-Met-Ligand eingesetzt. An Latexkügelchen immobilisiert, vermittelt InlB₃₂₁ deren Internalisierung in nicht-phagozytierende Zellen (Machner, et al. 2003; Braun et al., 1999). InlB₃₂₁ ist im Vergleich zum nativen InlB allerdings als weitaus schwächerer Aktivator von c-Met bekannt (Banerjee et al., 2004) und kann weder Zell-Migration noch DNA-Synthese induzieren (Niemann et al., 2007). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit durch Immunoblot-Analysen zunächst das Potential von InlB₃₂₁ zur Aktivierung der c-Met Signalkaskade detailliert untersucht. Die Wahl der Zelllinie fiel auf HeLa S3-Zellen, die bereits in Studien zur InlB-vermittelten Invasion (Braun et al., 1998) eingesetzt wurde und ein höheres Expressions-Niveau von c-Met zeigten (Abb. III.16) als die nach HGF/SF-Stimulation motile Zelllinie DU-145 (Wells et al., 2005). Da die c-Met-abhängige Signaltransduktion von der Zelldichte abhängt (Ishibe et al., 2006) wurde grundsätzlich darauf geachtet, dass die verwendeten HeLa S3-Zellen einen semikonfluenten Zustand erreichten aber nicht merklich überschritten. In den so optimierten Perturbations-Experimenten konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass die verkürzte Variante InlB₃₂₁ ein überaus starkes Stimulans der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met ist. Bereits innerhalb der ersten beiden Minuten nach Zugabe von 10nM InlB₃₂₁ wurde ein Maximum der c-Met-Aktivierung erreicht (Abb. III.18), wohingegen in Vero-Zellen 100nM InlB₃₂₁ nötig waren, um eine Autophosphorylierung von c-Met zu detektieren (Banerjee et al., 2004). Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf ein differentielles c-Met-Expressionsmuster in HeLa S3- und Vero-Zellen zurückzuführen. Aus den durchgeführten Studien kann somit geschlossen werden, dass InlB₃₂₁ in HeLa S3-Zellen ausreichend ist, um c-Met in eine Signal-kompetente Konformation (Niemann et al., 2007) zu überführen und eine Oligomerisierung als Voraussetzung für eine effiziente Autophosphorylierung zu fördern (Schlessinger, 2000). Die Charakterisierung der zeitlichen Aktivierungsdynamik zeigte eine Abnahme der c-Met-Autophosphorylierung im weiteren Stimulations-Verlauf, woraus geschlossen wird, dass die eingesetzte Menge von 10nM in einer schnellen Sättigung sämtlicher Membran-ständiger c-Met-Moleküle resultierte. Andererseits wäre eine weitere Zunahme bzw. ein Gleichgewicht in der Tyrosin-Phosphorylierung beobachtet worden.

Die eingesetzte Variante InlB₃₂₁ war vollkommen ausreichend, um den MAP-Kinase- und den PI3-Kinase-Signalweg zu aktivieren (Abb. III.18), wodurch die Fähigkeit zur Induktion der Phagozytose von InlB₃₂₁-beschichteten Latexkügelchen untermauert

wird (Braun et al., 1999). Die zeitliche Dynamik der Aktivierung des MAP-Kinase-Weges unterschied sich durch eine geringfügige Verzögerung von der c-Met-Autophosphorylierung. Ein Anstieg in der Aktivierung der Kinasen Mek1/2 und Erk1/2 trat erst nach vier Minuten ein und war nach sechs Minuten maximal. Die Signalübertragung von c-Met zur Akt1(PKB)-Kinase als funktionelles Element des PI3-Kinase-Signalweges verlief deutlich schneller und zeigte analog zur c-Met-Autophosphorylierung ein Maximum nach zweiminütiger InIB₃₂₁-Behandlung. Der weitere zeitliche Verlauf der InIB₃₂₁-stimulierten Signalübertragung offenbarte eine tendenzielle Abnahme der Aktivität aller analysierten Kinasen innerhalb der ersten acht Minuten nach Liganden-Präsentation. Trotzdem weitere Stimulations-Zeitpunkte die nachfolgende Dynamik klären müssten, wird aus den Westernblot-Analysen ersichtlich, dass die Stimulation der c-Met-Signalkaskade durch InIB₃₂₁ ein eher kurzfristiges Ereignis darstellt. Der InIB₃₂₁-c-Met-Rezeptorkomplex wird möglicherweise schnell endozytiert und degradiert, was durch die beobachtete negative Regulation von c-Met in der quantitativen Analyse V16743-affiner Substrate unterstützt wird (Abb. III.36). Im Vergleich hierzu konnte demonstriert werden, dass natives InIB eine unterschiedliche Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung von c-Met hervorruft (Shen et al., 2000). Ein Maximum wurde erst nach zehnminütiger Stimulation erreicht und die Phosphorylierung konnte noch nach mehr als 30 Minuten detektiert werden. Dies lässt auf eine mögliche Rolle des C-terminalen B-Repeats und der GW-Module in der Regulation der zeitlichen Dynamik der c-Met-Signalkaskade schließen. Die Bedeutung der Interaktion zu Glykosaminoglykanen könnte in einer zeitlichen Verzögerung der Inaktivierung durch Endozytose und Degradation des InIB-c-Met-Komplexes resultieren und somit eine essentielle Funktion in nur für natives InIB beschriebenen lang andauernden Prozessen wie DNA-Synthese und Zellmigration (Niemann et al., 2007) übernehmen.

Die hier durchgeführten Westernblot-Analysen demonstrierten somit erstmals auf molekularer Ebene, dass der N-terminale Bereich von nativem InIB ein potenter Aktivator von c-Met sowie der MAP-Kinase-Kaskade und des PI3-Kinase-Signalweges ist und eine mögliche Funktion der GW-Module in der zeitlichen Regulation der Signalübertragung liegt. Aus der charakterisierten Dynamik der c-Met-Signalkaskade wurde für die biochemische Analyse differentieller Phosphorylierungen an Kinasen der vierminütige Stimulations-Zeitpunkt mit InIB₃₂₁ als geeignet abgeleitet. Dies sollte einerseits gewährleisten, dass durch die quantitative Phosphokinom-Analyse möglichst früh auftretende Prozesse in der c-Met Signalkaskade erfasst werden, andererseits aber auch sicher stellen, dass die InIB₃₂₁-induzierte c-Met-Signalübertragung bereits ausreichend initialisiert war (Abb. III.18B). In perfekter Übereinstimmung mit den Westernblot-Analysen konnte durch die massenspektrometrische Quantifizierung eine InIB₃₂₁-induzierte Aktivierung der

Kinasen Erk1 und Erk2 des MAP-Signalweges charakterisiert werden (Abb. III.23). pS²¹ und pS⁹ von GSK3A und GSK3B waren ebenfalls deutlich stärker in der InlB₃₂₁ stimulierten Probe anwesend als im Kontrollansatz. Beide Phosphorylierungen wirken sich inhibierend für die GSK3-Funktion aus und werden durch die katalytisch aktive Kinase Akt1(PKB) übertragen (Srivastava und Pandey, 1998; Cross et al., 1995), weshalb sich GSK3A-pS²¹ und GSK3B-pS⁹ als Marker für die InlB₃₂₁-vermittelte Aktivierung des PI3-Kinase-Weges eignen. Mit spezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung der GSK3-Kinasen nach InlB₃₂₁-Stimulation bestätigt (Abb. III.24), womit erneut die Funktionalität der quantitativen Phosphokinom-Analyse untermauert wird. Drei Experimente wurden durch Stimulation mit InlB₃₂₁ im Vergleich zu nicht-behandelten Kontroll-Zellen durchgeführt. In einem weiteren Experiment wurde der Kontroll-Ansatz mit einer funktionslosen InlB₃₂₁-Variante (InlB₃₂₁/StreptIIc LoF) behandelt (Machner et al., 2003). Da die durchgeführten Immunoblot-Analysen beweisen, dass die funktionslose InlB₃₂₁-Variante im Vergleich zu InlB₃₂₁ nicht in der Lage ist, c-Met sowie den MAP- und den PI3-Kinase-Signalweg zu aktivieren und sich somit wie eine unbehandelte Kontrolle verhält (Abb. III.29), werden die in diesem Experiment erarbeiteten differentiellen Phosphorylierungen an Kinasen nach Stimulation des c-Met Signalweges durch die unterschiedlichen InlB₃₂₁-Varianten gemeinsam diskutiert.

B. Neue Komponenten der InlB₃₂₁-aktivierten c-Met-Signalkaskade

Die quantitative Phosphokinom-Analyse nach vierminütiger Stimulation von HeLa S3-Zellen mit 10nM InlB₃₂₁ resultierte zusätzlich zu den bereits bekannten differentiellen Phosphorylierungen der Kinasen Erk1, Erk2, GSK3A und GSK3B in der Identifizierung von neun weiteren differentiell phosphorylierten Kinasen (Abb. IV.1). Keine dieser Kinasen ist bislang mit einer Funktion in der *listeriellen* Wirt-Pathogen-Interaktion beschrieben oder im direkten Zusammenhang zur physiologischen c-Met-Signalkaskade untersucht worden.

Welche Rolle im Kontext der InlB-aktivierten c-Met Signalkaskade können diese Kinasen einnehmen? Eine Basis für zukünftige funktionelle Analysen bildet die Lage der Phosphorylierung im Protein sowie deren Regulationsrichtung und bereits charakterisierte zellulären Funktionen:

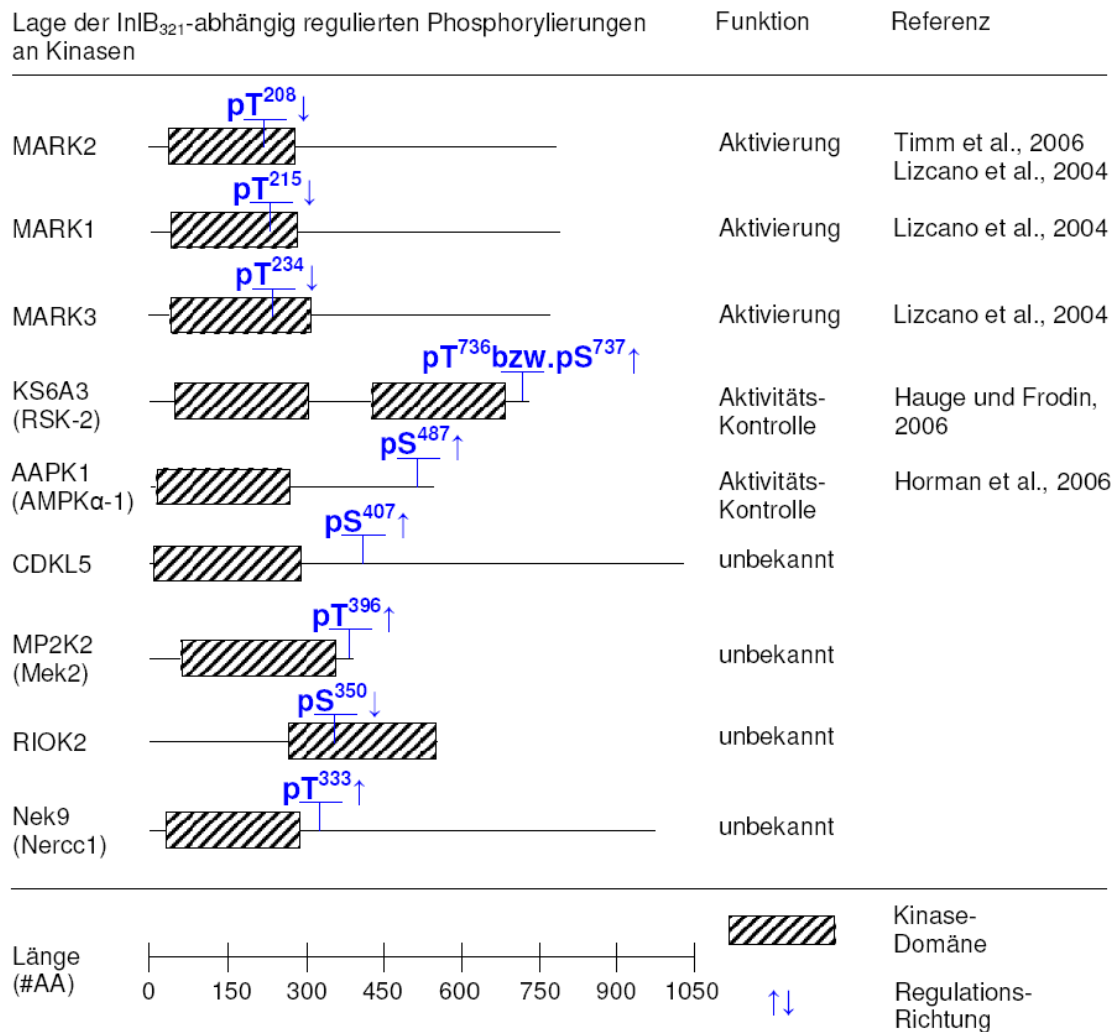


Abb. IV.1: Lage der nach InIB₃₂₁-Aktivierung der c-Met-Signalkaskade regulierten Phosphorylierungen an Kinasen bezogen auf die Kinase-Domäne.

Mikrotubuli-Regulation durch Kinasen der MARK-Familie

Die InIB₃₂₁-abhängig differentiell regulierte Phosphorylierung der Kinasen MARK1, MARK2 und MARK3 (MAP/Microtubule Affinity-regulating Kinase) liegt in der Aktivierungsschleife der katalytischen Kinase-Domäne. Das phosphorylierte tryptische Peptid aus der Aktivierungsschleife ist ebenfalls homolog in der Kinase MARK4. MARK4-spezifische Peptide wurden nicht identifiziert. Aufgrund der hohen Sequenz-Identität der Kinase-Domäne der Kinasen der MARK-Familie (Manning et al., 2002) und der fehlenden Affinität von MARK4 zu V16743 wird ersichtlich, dass der Zelltyp HeLa S3 die Kinase MARK4 vermutlich nicht exprimiert. Die Modifikation von Threonin T²⁰⁸/T²¹⁵/T²³⁴ wird durch die Kinase LKB1 bzw. Tao-1 katalysiert und führt zu einer Aktivierung der MARKs (Timm et al., 2006; Liczcano et al., 2004).

Kinasen der MARK-Familie wurden ursprünglich als für die Phosphorylierung von MAPs (Mikrotubuli-assoziierte Proteine) verantwortliche Kinasen identifiziert. Aktive MARKs phosphorylieren MAP2, MAP4 und Tau an für die Interaktion zu Mikrotubuli (MT) kritischen Aminosäuren. Dies führt zur Dissoziation der MT-stabilisierenden MAPs von den MT, wodurch MARKs eine Destabilisierung des MT-Zytoskeletts induzieren (Drewes et al., 1997). Durch die Regulation der MT-Dynamik übernehmen MARKs eine Funktion in der Ausbildung der Zellpolarität und in der Zellzyklus-Kontrolle (Tassan und Le, 2004). Ein direkter Einfluss eines Pathogens auf die Aktivität von MARKs wurde bereits gezeigt: der über ein Typ3-Sekretionssystem in die Wirtszelle injizierte Virulenzfaktor CagA von *Helicobacter pylori* interferiert durch direkte Bindung mit einer MARK2-katalysierten Tau-Phosphorylierung und induziert hierdurch Defekte in Zell-Zell-Kontakten und der Zell-Polarität, was zu einer Abstoßung von Zellen aus der Epithelschicht führt. Da in einer intakten epithelialen Zell-Architektur die Zellproliferation beschränkt ist, wird vermutet, dass die Blockierung von MARK2 durch CagA Zellen von Wachstums-fördernden Blockaden befreit und dadurch *H.pylori*-induzierte Darmkrebs-Bildung induziert (Saadat et al., 2007). Die hier gezeigte InlB₃₂₁-Aktivierung der c-Met-Signalkaskade scheint ebenfalls mit einer Repression der katalytischen Aktivität der MARKs einherzugehen. InlB₃₂₁ könnte durch c-Met-abhängige Aktivierung einer Phosphatase eine Blockierung einer basalen enzymatischen Aktivität der Kinasen der MARK-Familie auslösen. In wieweit dieser Vorgang mit der Modifikation von Zellpolarität bzw. Proliferation einhergeht, bleibt zu klären. Ein direkter Einfluss der Integrität des MT-Systems auf die Invasions-Effizienz des Pathogens wurde allerdings bereits gezeigt: die Destabilisierung von Mikrotubuli durch Nocodazol inhibiert die Phagozytose von *L. monocytogenes* in Makrophagen (Kuhn, 1998), dendritischen Zellen (Guzman et al., 1995) und endothelialen Zellen der Blut-Hirnschranke (Greiffenberg et al., 1998). Eine Blockierung der katalytischen Aktivität der Mikrotubuli-destabilisierenden Kinasen der MARK-Familie durch den *listeriellen* Virulenzfaktor InlB könnte somit eine wichtige Rolle in der Invasion übernehmen.

MP2K2 (Mek2) und KS6A3 (RSK-2): negative Rückkopplung der MAP-Kaskade?

Eine Aktivierung der Kinasen der Mek-Familie im InlB-aktivierten c-Met Signalweg wurde durch spezifische Antikörper demonstriert (Abb. III.18). Die massenspektrometrisch als differentiell regulierte Phosphorylierung des Threonins T³⁹⁶ ist am C-Terminus von Mek2 lokalisiert (Abb. IV.1). Während der N-Terminus der Kinasen der MEK-Familie als Interaktions-Domäne für Kinasen der Erk-Familie beschrieben ist, wurde in *in-vitro*-Studien demonstriert, dass Erk-Kinasen in der Lage sind, Proteine der Mek-Familie am C-Terminus zu phosphorylieren (Xu et al., 1999). Eine negative Regulations-Schleife von Erk zu Mek wird vermutet, konnte aber bislang nicht

nachgewiesen werden (Mansour et al., 1994). Neben den Kinasen der Mek- und Erk-Familie wurde eine weitere Komponente der MAP-Kinase-Kaskade identifiziert, welche bislang weder im InlB- noch im HGF/SF-stimulierten c-Met-Signalweg beschrieben wurde: Die mit einem Faktor von 6 nach Stimulation mit InlB₃₂₁ deutlich regulierte Phosphorylierung der Kinase RSK-2 (Ribosomal S6 Kinase-2) wurde am C-Terminus zugeordnet (Abb. IV.1). Die manuelle Überprüfung des Spektrums zeigte, dass das tryptische Peptid in zwei Populationen mit je einer Modifikation an Threonin T⁷³⁶ bzw. einer Modifikation an Serin S⁷³⁷ vorkommt. Die Kinase RSK-2 selbst war mit einem Wert von 2 gegenüber dem Kontrollansatz ebenfalls reguliert. Somit wird ein Einfluss der identifizierten Phosphorylierung auf eine konformationelle Änderung der Kinase wahrscheinlich. RSK-2 besitzt zwei Kinase-Domänen und für eine Aktivierung sind vier Phosphorylierungen beschrieben (Dalby et al., 1998). Eine Aktivierung von RSK-2 wird durch Bindung von Kinasen der Erk-Familie (Erk1 und Erk2) an die C-terminale MAP-Kinase-Bindungsstelle initialisiert. Das in dieser Arbeit als differentiell phosphoryliert identifizierte Threonin T⁷³⁶ bzw. Serin S⁷³⁷ liegt in der C-terminal lokalisierten MAP-Kinase-Bindungsstelle. Eine exakte Funktion von pT⁷³⁶/pS⁷³⁷ ist bislang nicht bekannt, allerdings wird eine durch diese Modifikation induzierte Verminderung der Affinität zu den RSK-2 aktivierenden Erk-Kinasen vermutet. pT⁷³⁶/pS⁷³⁷ könnte somit einen Mechanismus für eine negative Rückkopplungs-Kontrolle darstellen und eine Reaktivierung von RSK-2 verhindern. Eine Phosphorylierung von Serin S⁷³⁷ durch die N-terminale RSK-2-Kinasedomäne wurde gezeigt. (Hauge und Frodin, 2006). Kinasen der RSK-Familie sind an der Regulation des Zellzyklus (Fujita et al., 2003; Roux et al., 2004; Shahbazian et al., 2006) beteiligt und inhibieren die Apoptose-fördernden Proteine BAD (Tan et al., 1999) und DAPK (Anjum et al., 2005). Aufgrund der als inhibitorisch vermuteten C-terminalen Phosphorylierungen von Mek2 wie auch von RSK-2 ist eine negative Rückkopplungsschleife nach InlB₃₂₁-Aktivierung der c-Met-Signalkaskade eine attraktive Hypothese. Dies würde eine InlB₃₂₁-vermittelte Aktivierung von RSK-2 voraussetzen, was beispielsweise durch spezifische Antikörper gegen mit der Aktivität von RSK-2 korrelierenden Phosphorylierungen von Threonin T⁵⁷⁷ oder Serin S²²⁷ (Hauge und Frodin, 2006) überprüft werden kann.

AAPK1 (AMPK α -1) – Formierung des heterotrimeren AMPK-Komplexes

Von dem heterotrimeren Kinase-Komplex AMPK wurde in der katalytischen Untereinheit AMPK α -1 (5'-AMP-activated Protein Kinase catalytic subunit α -1) das phosphorylierte Serin S⁴⁸⁷ nach InlB₃₂₁-Stimulation als hochreguliert identifiziert (Abb. IV.1). AMPK α -1 selbst erschien als nicht reguliert, was zeigt, dass das phosphorylierte Serin S⁴⁸⁷ nicht zu einer die Interaktion zu V16743 beeinflussenden konformationellen Änderung beiträgt. Serin S⁴⁸⁷ liegt interessanter Weise in einer für

die Komplexierung der regulatorischen Untereinheiten β und γ durch die katalytischen α -Untereinheit kritischen Domäne (Wong und Lodish, 2006). Zur vollen Aktivierung der katalytischen α -Einheit durch LKB1-katalysierte Phosphorylierung am Threonin T¹⁷² (Hawley et al., 1996) ist die Bildung des heterotrimeren Komplexes mit den regulatorischen Untereinheiten essentiell (Crute et al., 1998; Dyck et al., 1996; Woods et al., 1996). Eine Reduktion der Aktivität von AMPK durch Akt1(PKB)-vermittelte Phosphorylierung an Serin S⁴⁸⁷ wurde bereits demonstriert (Horman et al., 2006; Woods et al., 2003). Eine Phosphorylierung von Serin S⁴⁸⁷ in der InIB₃₂₁-induzierten c-Met-Signalkaskade durch Akt1(PKB) ist durchaus denkbar, da diese Kinase innerhalb weniger Minuten nach Liganden-Präsentation aktiviert wird (Abb. III.18). Eine mögliche Reduktion der katalytischen AMPK-Aktivität durch InIB₃₂₁ könnte durch einen Einfluss der Serin S⁴⁸⁷-Modifikation auf die Komplex-Formierung bzw. -Stabilität der drei AMPK-Untereinheiten erklärt werden. Der AMPK-Komplex übernimmt in der Zelle eine Rolle als Energiesensor, der das Verhältnis von ATP:AMP registriert und durch einen Einfluss auf anabole und katabole Prozesse die Energie-Homeostasis kontrolliert (Hardie et al., 2003; Hardie et al., 1999). Erst jüngst konnten neben der Energie-Kontrolle ein Einfluss von AMPK auf die Organisation des Aktinzytoskeletts (Koh und Chung, 2007) sowie auf die Regulation von Zellpolarität und Zellzyklus demonstriert werden (Lee et al., 2007). Weiterführende Studien sollten deshalb zeigen, ob AMPK im InIB-c-Met-Signalweg eine katalytische Aktivität übernimmt und möglicherweise in die *listerielle* Invasion involviert ist.

RIOK2 und CDKL5

Kinasen der RIOK-Familie (Right Open Reading Frame Kinase) zählen zu den atypischen eukaryotischen Kinasen und über deren Funktion ist nur wenig bekannt. Funktionelle Studien aus *S. cerevisiae* demonstrierten, dass RIOK1 eine essentielle Rolle in der Zellzyklus-Progression übernimmt und eine RIOK1-Aktivität für den Eintritt in die S-Phase und den Abschluss der Mitose benötigt wird (Angermayr et al., 2002). RIOK1 und RIOK2 wurden als Faktoren identifiziert, die die Prozessierung der 18S rRNA und somit die Wachstumsrate beeinflussen (Geerlings et al., 2003; Vanrobays et al., 2001). Das nach InIB₃₂₁-Stimulation negativ regulierte phosphorylierte Serin S³⁵⁰ liegt in der Kinase-Domäne von RIOK2 (Abb. IV.1) und wurde bislang nicht beschrieben. Betrachtet man die Konservierung innerhalb der Kinasen der RIO-Familie in *H. Sapiens*, *M. Musculus*, *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* und *C. elegans*, so fällt auf, dass die zu Serin S³⁵⁰ homologe Position durch Threonin, Alanin, Glutamin- oder Asparaginsäure ersetzt ist (Abb. IV.2). In der Funktionsanalyse von Phosphorylierungs-Stellen wird häufig ein Austausch von Serin bzw. Threonin zu Alanin verwendet, um eine Phosphorylierung zu blockieren. Im Gegensatz hierzu kommt ein Austausch von Serin oder Threonin zu Asparagin- bzw.

RIOK2_HS	AEVYG <u>S</u> ENESER
RIOK2_MM	AKVWR <u>S</u> ELEKEA
RIOK2_SC	RDVKR <u>T</u> DN----
RIOK2_CE	DEDD <u>S</u> DDSKSME
RIOK1_HS	VRELF <u>E</u> FTDPS
RIOK2_DM	PTLVT <u>A</u> ASVEID
RIOK3_HS	IRMW <u>A</u> EKEMHNL

Abb. IV.2: Sequenzvergleich der Kinasen der RIO-Familie in Mensch, Maus, Fruchtfliege, Wurm und Hefe. Die zum Serin S³⁵⁰ der menschlichen Kinase RIOK2 homologen Aminosäuren sind unterstrichen (ClustalW).

Glutaminsäure zum Einsatz, um durch die negativen Ladungen der Carboxylgruppe eine Phosphorylierung nachzuahmen (Arokium et al., 2007; Kurihara et al., 2007; Lin et al., 2007; Canovas und Guadagno, 2007). Dies lässt vermuten, dass das homologe Serin zwar keine essentielle Funktion für die katalytische Aktivität von RIOK2 besitzt; in Mensch, Maus und Hefe aber könnte die nach InIB₃₂₁-Stimulation detektierte differentielle Phosphorylierung eine regulatorische Funktion übernehmen.

Die Proteinkinase CDKL5 (Cyclin-dependent Kinase-like 5) gehört zur CMGC-Familie (Manning et al., 2002) und besitzt eine hohe Homologie zu spezifischen Sequenz-Merkmalen der Kinase-Domäne der MAP- und CDK-Kinasen (Montini et al., 1998). Das detektierte hochregulierte Phosphoserin S⁴⁰⁷ liegt außerhalb der Kinase-Domäne (Abb. IV.1) und besitzt keine Homologie zu Proteinen der MAPK- und CDK-Familie. Interessanter Weise besitzt CDKL5 als einzige der fünf im humanen Genom kodierten CDKL-Kinasen eine umfassende C-terminale Sequenzverlängerung, deren Domänenstruktur noch nicht geklärt ist. Somit findet sich keine Homologie von Serin S⁴⁰⁷ zu den übrigen vier humanen CDKL-Kinasen, allerdings existiert ein homologes Serin in der murinen CDKL5-Kinase und Serin S⁴⁰⁷ könnte eine spezifische Funktion in murinen und humanen CDKL5-Kinasen übernehmen. Eine funktionelle Verbindung wurde zwischen Mutationen im *cdkl5*-Gen und dem Rett-Syndrom, einer neurodegenerativen Erkrankung demonstriert (Mari et al., 2005; Scala et al., 2005; Tao et al., 2004; Weaving et al., 2004). Allerdings betrifft keine der Mutationen direkt oder indirekt Serin S⁴⁰⁷, weshalb aus den publizierten Studien kein möglicher Zusammenhang zur Funktionalität von CDKL5 hergestellt werden kann. CDKL5 ist bisher als eine hauptsächlich im Kern lokalisierte Kinase beschrieben und möglicherweise durch Interaktion mit dem Chromosomen-assoziierten Protein MeCP2 an der Regulation von Genexpression beteiligt (Mari et al., 2005; Ashraf und Ip, 1998).

Der Zellzyklus-Regulator Nek9 (Nercc1):

Nek9 zählt zur Familie der Nek-Kinasen (NimA-like Kinases), die erstmals durch die Zellzyklus-Kinase NimA (Never in Mitosis A) des filamentösen Pilzes *Aspergillus nidulans* dargestellt wurde (Morris, 1975). Nek9 wurde ursprünglich als Nercc1 klassifiziert (Roig et al., 2002) und ist als Regulator des Zellzyklus beschrieben

(O'Regan et al., 2007). Eine Aktivierung der Kinase Nek9 geht mit einer Phosphorylierung des Threonins T²¹⁰ in der Kinase-Domäne einher und aktiviertes Nek9 lokalisiert während der Mitose an den Centriolen (Roig et al., 2005). Ein das Threonin T²¹⁰ tragendes tryptisches Peptid wurde in der vorliegenden Arbeit nicht detektiert, weshalb keine Aussage über eine mögliche Aktivierung von Nek9 im InlB-c-Met-Signalweg getroffen werden kann. Das phosphorylierte Threonin T³³³ liegt C-terminal einer Kernlokalisations-Sequenz. Nek9 zeigt eine nukleo-zytoplasmatische Verteilung, wobei bislang nichts über die Kontrolle der Relokalisation von Nek9 zwischen Kern und Zytoplasma bekannt ist. Threonin T³³³ könnte ein erster Mechanismus sein, der die Verteilung von Nek9 in der Zelle kontrolliert. Die Bedeutung der in dieser Arbeit erstmals detektierten differentiellen Phosphorylierung am Threonin T³³³ von Nek9 für den c-Met-Signalweg wird dadurch hervorgehoben, dass nicht nur nach Stimulation mit dem *listeriellen* Virulenzfaktor InlB₃₂₁ sondern auch nach Präsentation des physiologischen Liganden HGF/SF eine deutliche Stimulation der Modifikation induziert wird. Nek9 zeichnet sich somit als fundamentale Komponente des c-Met-Signalweges aus und wurde in der vorliegenden Arbeit für erste funktionelle Studien ausgewählt. Die Diskussion erfolgt im anschließenden Kapitel.

Zusätzlich zu den differentiell phosphorylierten Kinasen wurden unter V16743-affinen Substraten auch Proteine ohne Kinase-Aktivität nach InlB₃₂₁-Behandlung als modifiziert beobachtet: Serin S⁴⁵⁵ des Proteins ACLY war mit einem Faktor von 2.5 reguliert, von CABL1 wurden das Threonin T⁴¹⁵ mit Werten von 2 bis 2.3 und das Serin S²⁹¹ mit einem Faktor von 0.4 detektiert und Serin S⁶⁵⁹ von K0528 zeigte einen Wert von 2.5. Das InlB-c-Met-System bietet in Zukunft eine Möglichkeit zur funktionellen Charakterisierung dieser Modifikationen an.

Zusammenfassend führte der hier vorgestellte experimentelle Ansatz durch die Analyse differentiell phosphorylierter Modifikationen zur Identifizierung der Kinasen CDKL5, RIOK2, RSK-2 (KS6A3), AMPK α -1 (AAPK) und Nek9 als potentielle neue Komponenten des durch den *listeriellen* Virulenzfaktor InlB₃₂₁ stimulierten c-Met-Signalwegs. Mögliche Funktionen der Kinasen bzw. der beobachteten Modifikationen an den jeweiligen Proteinen wurden anhand von Homologie-Analysen und Literaturwissen bereits eingegrenzt und sind in Abb. IV.3 abschließend dargestellt. Zukünftige Studien können die hier erarbeiteten Ergebnisse als Basis für die funktionelle Charakterisierung der Kinasen und Phosphorylierungs-Stellen im InlB-c-Met-System und im Kontext der *listeriellen* Invasion heranziehen.

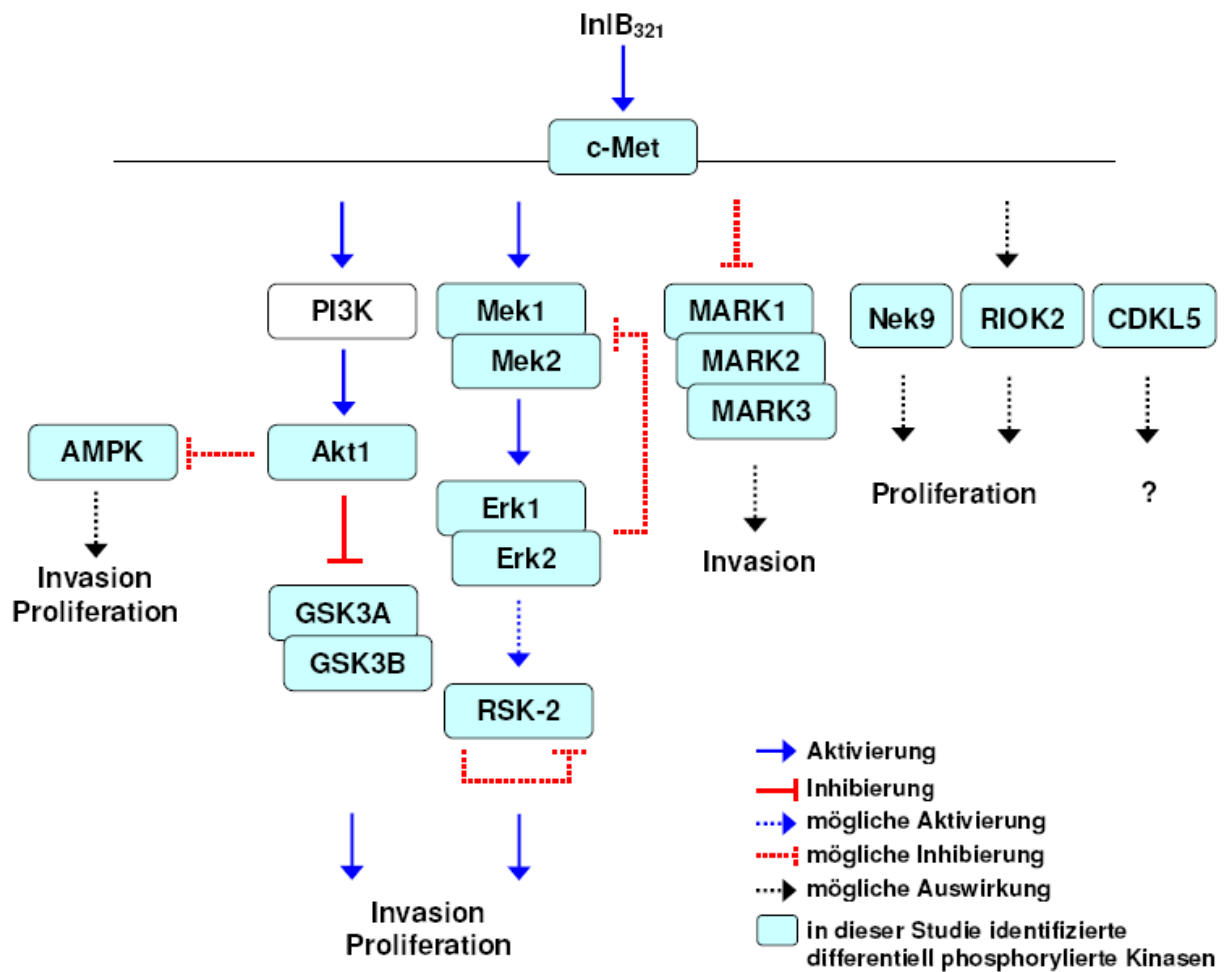


Abb. IV.3: Zusammenfassung der in dieser Arbeit identifizierten differenziell phosphorylierten Kinasen im InIB₃₂₁-aktivierten c-Met-Signalweg. Anhand von bereits beschriebenen Funktionen der Kinasen bzw. der Phosphorylierungs-Stellen wurde eine erste hypothetische Eingrenzung zum c-Met-Signalweg getroffen.

3. Die mitotische Kinase Nek9 im InlB₃₂₁-c-Met-Signalweg

Aufgrund der deutlichen Induktion der Threonin T³³³-Modifikation an Nek9 sowohl durch den *listeriellen* Virulenzfaktor InlB₃₂₁ als auch durch das Wachstumshormon HGF/SF wurde Nek9 in der vorliegenden Arbeit weitergehend charakterisiert.

Die Familie der Nek-Kinasen besteht in Säugetier-Zellen aus elf Mitgliedern (Forrest et al., 2003), die in der Kinase-Domäne 40 - 45% Homologie aufweisen. Die C-Termini der Nek-Kinasen zeigen eine große Diversität in der Länge und Domänenstruktur, was auf unterschiedliche Funktionen schließen lässt (O'Connel et al., 2003). Während Nek11 durch Schädigung der DNA aktiviert wird und vermutlich eine Rolle in der DNA-Reparatur übernimmt (Noguchi et al., 2002), stellte sich heraus, dass Mutationen in den Genen *nek1* und *nek8* als mögliche Ursache für die Entstehung der Polycystischen Nierenerkrankung (PKD, Polycystic Kidney Disease) in Frage kommen (Liu et al., 2002; Upadhyya et al., 2000). Für die Kinasen Nek3, 4, 5 und 10 ist bislang noch keine Funktion beschrieben, wohingegen experimentelle Daten eindeutig zeigen, dass Nek2, 6, 7 und 9 als Regulatoren des Zellzyklus fungieren (O'regan et al., 2007).

Nek9 zählt mit einer Länge von 979 Aminosäuren zu den größten Kinasen der Nek-Familie und besitzt N-terminal ein PEST-Motif sowie eine typische eukaryotische Serin/Threonin-Kinase-Domäne. Zentral gelegen folgt eine Kernlokalisations-Sequenz (KLS) und sieben RCC-Wiederholungen. Zwischen der KLS und den RCC-Wiederholungen lokalisiert das nach Aktivierung des c-Met-Signalweges phosphorylierte Threonin T³³³ (Abb. IV.4).

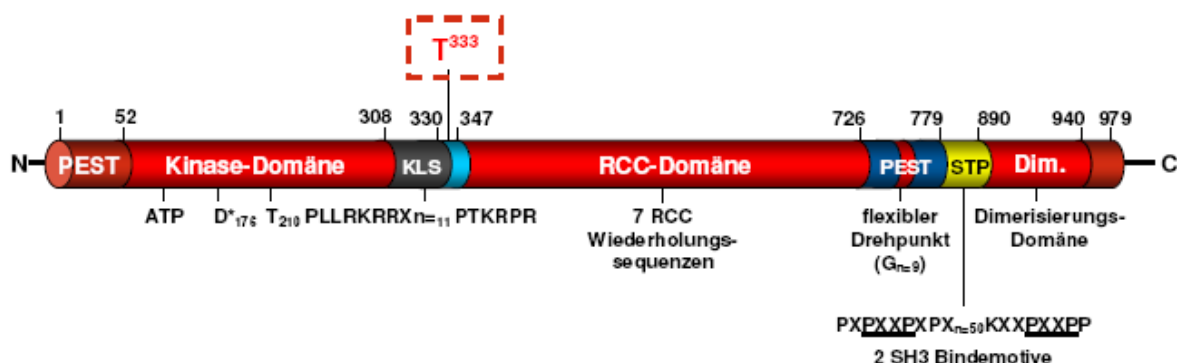


Abb. IV.4: Domänen-Aufbau der Serin/Threonin-Kinase Nek9. Das nach InlB₃₂₁- und HGF/SF-Induktion phosphorylierte Threonin T³³³ liegt zwischen der Kernlokalisations-Sequenz (KLS) und den RCC-Wiederholungen. Dim.: Dimerisierungs-Domäne. STP: Serin/Threonin/Prolin-reiche Sequenz (Roig et al., 2002).

Die RCC-Wiederholungssequenzen besitzen eine hohe Homologie zu dem Protein RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation), einem Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF, Guaninnucleotid Exchange Factor) der kleinen GTPase Ran. Nek9 fungiert aber vermutlich nicht als RanGEF, da für diese Funktion im Protein RCC1 kritische Aminosäuren in Nek9 fehlen (Holland et al., 2002). Die RCC-Wiederholungen werden von einem weiteren PEST-Motif flankiert, welches neun Glycinreste einschließt. Von diesen wird angenommen, dass sie als flexibler Drehpunkt im Protein agieren. Anschließend folgt eine STP-reiche (Serin/Threonin/Prolin) Sequenz, die zwei SH3-Bindemotive umfasst. C-terminal in Nek9 liegt eine Dimerisierungsdomäne (Roig et al., 2002).

Eine mögliche Funktion der Nek9-Kinase wird in der Ausbildung des mitotischen Spindel-Apparates und der Chromosomen-Separation durch Regulation der Mikrotubuli-Funktion gesehen (O'egan et al., 2007). Aktiviertes Nek9 lokalisiert während der Mitose-Phase an den Centriolen (Roig et al., 2005). Darüber hinaus wird eine zusätzliche Funktion in der Interphasen-Progression postuliert. Nek9 komigriert mit Proteinen des Chromatin-assoziierten FACT-Komplexes in der Gelpermeations-Chromatographie und die Untereinheit SSRP-1 des FACT-Komplexes wird in einer Nek9-Immunopräzipitation angereichert. Der nukleäre FACT-Komplex (Facilitation of Chromatin Transcription) unterstützt das Fortschreiten der Polymerase während der Transkription und Replikation (Tan und Lee, 2004).

Aus den bereits publizierten Studien über Nek9 stellt sich unter anderem die Frage nach einem Signalweg, in dem Nek9 eine Rolle übernimmt. Bis heute ist noch keine Signalkaskade bekannt, die die bisher bekannten Funktionen von Nek9 im Zellzyklus beeinflussen kann. In dieser Arbeit konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen dem Wachstumsfaktor-Rezeptor c-Met und der Serin/Threonin-Kinase Nek9 gezeigt werden. Die Phosphorylierung an Threonin T³³³ wird sowohl durch den physiologischen c-Met Liganden HGF/SF (Tab. III.13) als auch durch den *listeriellen* Virulenzfaktor InlB₃₂₁ (Tab. III.7, Tab. III.10) deutlich induziert. Eine funktionelle Zuordnung der mitotischen Kinase Nek9 zum c-Met-Signalweg, der mitotische Prozesse reguliert (Birchmeier et al., 2003), erscheint als sinnvoll. Da c-Met ebenfalls motogene Prozesse reguliert, wäre eine bisher nicht bekannte c-Met-abhängige Funktion von Nek9 beispielsweise durch Regulation des Aktinzytoskeletts jedoch ebenfalls denkbar. Nek9 zeigt eine nukleo-zytoplasmatische Verteilung, wobei ein nur sehr geringer Anteil von ca. 5% im Zellkern lokalisiert (Roig et al., 2005). Die Detektion der Phosphorylierung an Threonin T³³³ von Nek9 erfolgte in Gesamt-Zelllysaten, weshalb aus diesen Experimenten nicht unterschieden werden kann, ob eine spezifische Subpopulation angereichert wurde, welche beispielsweise nur im Kern oder nur im Cytosol lokalisiert. Die allerdings bereits nach vierminütiger

Stimulation der c-Met-Kaskade sehr schnell ansteigende Nek9-Phosphorylierung im Vergleich zum Kontroll-Ansatz deutet auf eine Modifikation einer cytosolischen Nek9-Population hin.

Dies wird durch die in der Immunopräzipitation von Nek9 massenspektrometrisch identifizierten ko-präzipitierten Proteine unterstrichen. Basierend auf der Annahme, dass Nek9 nach Aktivierung der c-Met Signalkaskade im Cytosol der Zelle modifiziert wird, wurden potentielle Interaktionspartner nach Anreicherung von Nek9 aus cytosolischen Extrakten untersucht (Abb.III.39). Eine Vielzahl der identifizierten direkt oder indirekt mit Nek9 interagierenden Proteine zählen zu Komponenten des Aktinzytoskeletts wie beispielsweise Untereinheiten des Arp2/3-Komplexes, Spectrin, Filamin und Actinin (Tab. III.15). Darüber hinaus konnten Mitglieder der ERM-Familie, die eine molekulare Verbindung zwischen der Plasmamembran und dem Aktinzytoskelett stellen, der für c-Met beschriebene und mit ERM-Proteinen interagierende Ko-Rezeptor CD44 (Orian-Rousseau et al., 2007; Bertotti und Comoglio, 2003; Orian-Rousseau et al., 2002) und Clathrin identifiziert werden, was auf eine Nek9-Lokalisation am Zytoskelett in der Plasmamembran-nahen Zellperipherie deuten lässt. Die bislang bekannten Interaktionspartner von Nek9 - die GTPase Ran (Roig et al., 2002), die Nek-Kinasen Nek6 und Nek7 (Belham et al., 2003; Roig et al., 2002), Proteine des FACT-Komplexes (Tan und Lee, 2004), γ -Tubulin (Roig et al., 2005) oder Bicaudal D (Holland et al., 2002) wurden nicht identifiziert. Somit stellen die in dieser Arbeit beschriebenen Interaktionspartner neue Anhaltspunkte für bislang unbekannte Funktionen von Nek9 im Zytoplasma der Zelle dar. Aufgrund der überwiegenden Lokalisation von Nek9 im Zytoplasma (Roig et al., 2005) sind bislang unbekannte Funktionen von Nek9 in diesem Kompartiment sehr wahrscheinlich. Nek9 könnte eine regulatorische Funktion in der Signalübertragung von c-Met zum Aktinzytoskelett übernehmen, was sowohl für die HGF/SF-vermittelte motogene c-Met-Signalübertragung wie auch für die *listerielle* Invasion essentiell ist.

Interessanter Weise resultierte die Aktivierung der Tyrosinkinase c-Met durch InIB₃₂₁ neben der Threonin T³³³-Phosphorylierung in einem direkten Einfluss auf die Interaktion von Nek9 zu den identifizierten ko-präzipitierten Proteinen (Abb. III.40). Nach Aktivierung von c-Met ist das Bandenmuster eines eindimensional getrennten Eluates Nek9-interagierender Proteine deutlich weniger komplex. Die größte Differenz zeigt eine ca. 40kDa-große Bande, in der quantitativ Aktin identifiziert wurde (Tab. III.15). Diese Bande ist bereits nach vierminütiger InIB₃₂₁-Stimulation nur noch sehr schwach detektierbar (Abb. III.40). Eine Unterbrechung der direkten oder indirekten Interaktion von Nek9 zu Aktin oder zu Komponenten des Aktinzytoskeletts kann durch Degradation oder Relokalisation von Nek9 erklärt werden. Da eine konstante Nek9-Expression im Zellzyklus sowie eine Funktion im Zellkern

beschrieben wurde, ist eine c-Met-gesteuerte Relokalisation von Nek9 aus dem Zytoplasma in den Zellkern eine zu prüfende These. Bislang konnte allerdings noch keine Modifikation identifiziert werden, welche die im inaktiven Protein wahrscheinlich durch eine intramolekulare Interaktion maskiert vorliegende funktionelle KLS (Roig et al., 2002) für Kernimport-Systeme zugänglich machen könnte. Die Phosphorylierung von Threonin T³³³ stellt einen ersten möglichen Mechanismus dar, der dazu führen kann, dass Nek9 nach Aktivierung einer Wachstumsfaktor-Signalkaskade in den Kern relokalisiert.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Immunoblot-Analyse einer Nek9-Immunopräzipitation unterstützt die These der c-Met-abhängigen Nek9-Relokalisation: in einem Zeitraum von bis zu sechzehn Minuten nach InlB₃₂₁-Stimulation nimmt die über einen polyklonalen Antikörper angereicherte Menge an Nek9 aus einem cytosolischen Zellextrakt leicht ab (Abb. III.42). Besonders deutlich zeigte sich eine Abnahme von Nek9 in einer Immunopräzipitation mit einem Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrat Antikörper, welcher spezifisch am Threonin T³³³ phosphoryliertes Nek9 anreichert (Abb. III.44). Mit zunehmender InlB₃₂₁-Stimulationsdauer nahm die angereicherte Menge an Nek9 aus einem cytosolischen Lysat signifikant ab. Da die Expression von Nek9 über den gesamten Zellzyklus gesehen konstant ist und nur ein sehr geringer Anteil des gesamten Nek9-Proteingehaltes einer Zelle im Kern lokalisiert (Roig et al., 2005), kann eine erste Hypothese aufgestellt werden, dass spezifisch an Threonin T³³³-phosphoryliertes Nek9 nach Aktivierung der c-Met-Signalkaskade in den Kern transloziert und Threonin T³³³ ein regulatorisches Element der KLS darstellt. Eine Degradation oder abnehmende Zugänglichkeit der für die Immunopräzipitation eingesetzten Antikörper kann trotzdem aus den durchgeführten Experimenten nicht vollständig ausgeschlossen werden und muss in weiteren Studien validiert werden.

Neben einer möglichen Funktion in der Demaskierung der KLS kann die Modifikation von Threonin T³³³ auch eine Voraussetzung zur Aktivierung von Nek9 darstellen. Da postuliert wird, dass die Aktivierung von Nek9 durch Dimerisierung über den C-Terminus gefördert wird, kann eine intramolekulare Interaktion der Kinase-Domäne und der RCC-Wiederholungssequenzen neben der Maskierung der KLS ebenfalls zur Autoinhibierung von Nek9 beitragen (Roig et al., 2005; Roig et al., 2002). Wie aus Studien mit RCC-Deletionsmutanten hervorging, ist die RCC-Domäne notwendig, um die Nek9-Aktivität zu blockieren. Eine Phosphorylierung von Threonin T³³³ und eine dadurch induzierte mögliche Unterbrechung der intramolekularen Interaktion kann eine notwendige Voraussetzung für eine Nek9-Dimerisierung und Autophosphorylierung von Threonin T²¹⁰ in der Kinase-Domäne darstellen. Der Aktivitäts-Status von Nek9 im Zusammenhang mit der Aktivierung der c-Met

Signalkaskade konnte durch die massenspektrometrische Peptidfragmentierung nicht analysiert werden, da das generierte tryptische Peptid, welches Threonin T²¹⁰ einschließt, außerhalb des detektierbaren Massenbereichs lag.

Welche Kinase im c-Met-Signalweg könnte die Threonin T³³³-Phosphorylierung an Nek9 katalysieren? Bioinformatische Vorhersagen zeigen, dass Threonin T³³³ in einer typischen AGC-Kinase-Konsensus-Sequenz liegt. Da die AGC-Kinase Akt1(PKB) im InlB-c-Met-Signalweg aktiviert wird, wurde zunächst ein Einfluss des PI3K/Akt1(PKB)-Signalweges auf die detektierte Nek9-Modifikation hin untersucht. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde erneut die massenspektrometrische Quantifizierung gewählt, um nach Blockierung des PI3K/Akt1(PKB)-Signalweg durch den PI3K-Inhibitor LY294002 einen Einfluss auf die InlB₃₂₁-induzierte Threonin T³³³-Phosphorylierung zu detektieren. Die Anreicherung von Nek9 erfolgte über einen Protein-spezifischen Antikörper aus einem Gesamt-Zellextrakt. Das Ergebnis dieses Experimentes zeigte, dass trotz Inhibierung des PI3K-Signalweges die Phosphorylierung von Threonin T³³³ InlB₃₂₁-abhängig induziert werden konnte (Abb.III.48). Da Nek9 als mitotische Kinase beschrieben ist, wurde in einem analogen Experiment eine Auswirkung der Blockierung des MAP-Kinase-Weges auf die Nek9-Modifikation hin untersucht. Neben der proliferativen Signalweiterleitung der MAP-Kinasen ist dieser Signalweg ebenfalls in die Kontrolle des Aktinzytoskeletts involviert. Beispielsweise wurde Cortactin, welches über die Rekrutierung von N-WASP die Aktivität des Arp2/3-Komplexes beeinflussen kann, als Substrat der Erk-Kinasen identifiziert (Selbach und Backert, 2005). Die Blockierung der MAP-Kinase-Kaskade durch den MEK-Inhibitor U0126 zeigte einen deutlichen Effekt auf die InlB₃₂₁-stimulierte Threonin T³³³-Phosphorylierung (Abb. III.49). Die Signalstärke des Threonin T³³³-phosphorylierten Nek9-Peptides war nach Vorbehandlung der Zellen mit U0126 und InlB₃₂₁-Stimulation auf einem mit dem nicht-stimulierten Kontrollansatz vergleichbaren Niveau. Durch die Kombination der quantitativen Phosphopeptid-Analyse mit der Nek9-Immunopräzipitation im Zusammenhang mit der InlB₃₂₁-stimulierten c-Met Signalkaskade konnte somit bereits eine erste mögliche Zuordnung von Nek9 zu einem c-Met-abhängigen Signalmodul, dem MAP-Kinase-Modul, getroffen werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals eine Beziehung zwischen der mitotischen Kinase Nek9 und dem c-Met-Signalweg gezeigt werden. Im Cytosol lokalisiertes Nek9 interagiert direkt oder indirekt mit Komponenten des Aktinzytoskeletts und eine MAP-Kinase-induzierte Nek9-Modifikation an Threonin T³³³ durch Aktivierung von c-Met über den *listeriellen* Virulenzfaktor InlB₃₂₁ führt möglicherweise zu einer Demaskierung der KLS und zu einer Nek9-Relokalisation. Die Modifikation von Threonin T³³³ könnte zusätzlich an der Dimerisierung und der

Aktivierung von Nek9 beteiligt sein (Abb. IV.5). Die hier gezeigten Ergebnisse bieten eine erste Hypothese zur funktionellen Charakterisierung von Nek9 im c-Met-Signalweg an. Weitergehende Studien sollten die zelluläre Verteilung und Aktivität von Nek9 im mit nativen InIB bzw. mit HGF/SF stimulierten c-Met-Signalweg sowie eine mögliche Rolle in der *listeriellen* Invasion adressieren.

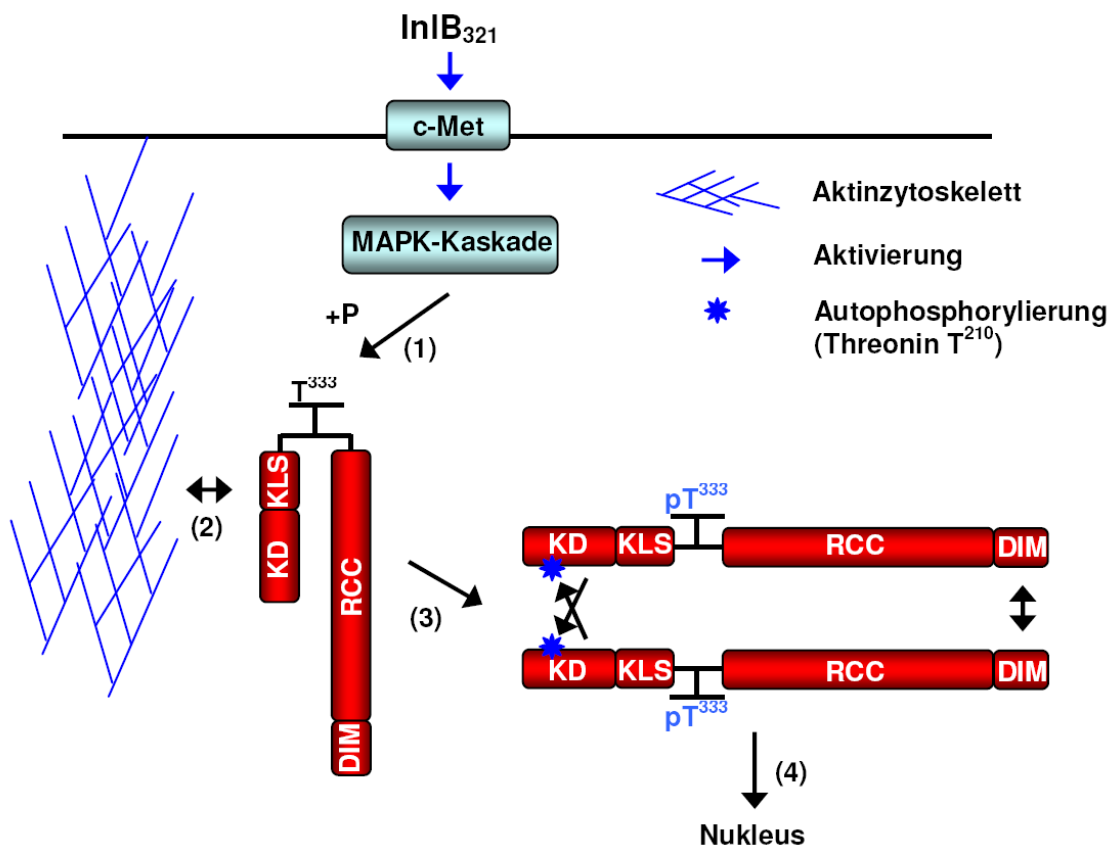


Abb. IV.5: Forciert InIB eine Relokalisation von Nek9 im c-Met-Signalweg? Eine InIB₃₂₁-c-Met-abhängige MAP-Kinase-induzierte Phosphorylierung von Threonin T³³³ der Kinase Nek9 (1) könnte eine Interaktion zu Komponenten des Aktinzytoskeletts unterbrechen und zu einer konformationellen Änderung von Nek9 führen (2). Diese könnte in der Demaskierung der Kernlokalisations-Sequenz (KLS) wie auch in der Dimerisierung von Nek9 resultieren (3). Aktiviertes Nek9 könnte anschließend in den Zellkern relokalisieren (4) (KD: Kinase-Domäne; RCC: RCC-Wiederholungs-Sequenzen; DIM: Dimerisierungsdomäne).

4. Imitiert InIB den Wachstumsfaktor HGF/SF?

Seit der Entdeckung von InIB als ersten bakteriellen Liganden der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met stellt sich die Frage, ob *L. monocytogenes* die physiologische HGF/SF-induzierte c-Met-Signalkaskade nachahmt oder ob InIB auf molekularer Ebene spezifische Ereignisse induziert, welche eine effiziente Invasion des Pathogens forcieren. Beide Liganden induzieren die Autophosphorylierung von c-Met, wodurch Adapter-Proteine wie Shc, Gab1 und Cbl rekrutiert werden (Sun et al., 2005; Basar et al., 2005; Ireton et al., 1999). Dies führt zu einer Aktivierung der PI3-Kinase und kleiner GTPasen (Bosse et al., 2007; Bierne et al., 2001; Ireton et al., 1996), beides essentielle Ereignisse für die *listerielle* Invasion. Sowohl HGF/SF wie auch InIB stimulieren die Ubiquitinierung von c-Met und dessen Clathrin-vermittelte Endozytose (Li et al., 2005; Veiga und Cossart, 2005). Überraschenderweise konnte gezeigt werden, dass die externe Zugabe sowohl von InIB wie auch von HGF/SF in der Lage ist, eine Invasion von *L. monocytogenes* ($\Delta inIB$) in Vero-Zellen zu stimulieren (Banerjee et al., 2004). Darüber hinaus benötigen beide Liganden die Interaktion zu Glykosaminoglykanen, um eine Tyrosin-Phosphorylierung von c-Met zu potenzieren (Lyon et al., 2004; Banerjee et al., 2004; Lyon et al., 2002; Jonquieres et al., 2001). Dies deutet darauf hin, dass die für die Invasion einzig notwendige Eigenschaft von InIB die Imitation der HGF/SF-vermittelten c-Met-Aktivierung darstellt. Trotzdem ahmt InIB HGF/SF nicht exakt nach: beide Liganden zeigen keinerlei Sequenzhomologie und sind strukturell verschieden (Bierne und Cossart, 2002). Die Kinetik der c-Met-Aktivierung durch beide Liganden unterscheidet sich (Shen et al., 2000) und bei gleicher Konzentration induziert InIB im Vergleich zu HGF/SF eine stärkere Aktivierung des Ras-MAPK-Signalweges (Copp et al., 2003). Darüber hinaus kompetitieren HGF/SF und InIB nicht um Bindungsstellen am c-Met-Rezeptor (Shen et al., 2000), was durch Strukturanalysen eindrucksvoll bestätigt wurde (Niemann et al., 2007; Holmes et al., 2007; Stamos et al., 2004).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass InIB₃₂₁ und HGF/SF die MAP-Kinase- sowie die PI3-Kinase-Kaskade aktivieren und zumindest im Falle von InIB₃₂₁ hierfür eine Interaktion zu Glykosaminoglykanen nicht essentiell ist. Ein Vergleich zeigt weiterhin, dass beide Liganden in der Lage sind, die erstmals in dieser Arbeit identifizierten Phosphorylierungen an Threonin T³³³ der Kinase Nek9 (Tab. III.7; Tab. III.10; Tab. III.13)) und von Serin S⁴⁸⁷ der katalytischen Untereinheit α -1 der heterotrimeren Kinase AMPK zu induzieren (Tab. III.7; Tab. III.13). Diese Ergebnisse deuten eine Nachahmung der HGF/SF-induzierten c-Met-Signalkaskade durch den *listeriellen* Virulenzfaktor InIB₃₂₁ an. Interessanterweise konnten darüber hinaus qualitative Unterschiede in der c-Met-Signalkaskade nach Stimulation mit den beiden Liganden beobachtet werden: die Reprimierung der Phosphorylierung an

Serin S³⁵⁰ der Kinase R1OK2 wurde nur durch Stimulation mit dem *listeriellen* Liganden beobachtet (Tab. III.10). HGF/SF zeigte keinen Einfluss auf diese Modifikation, weshalb sich unter den gewählten experimentellen Bedingungen die Kinase R1OK2 als spezifisches Effektor-Protein des *listeriellen* Virulenzfaktors darstellt. Im Gegensatz hierzu wurde nach HGF/SF-Induktion eine differentielle Phosphorylierung am C-terminal gelegenen Serin S⁶³⁷ der Kinase MLTK (Mixed Lineage Kinase-like Mitogen-activated Protein Triple Kinase) identifiziert (Abb. III.35). MLTK aktiviert Kinasen wie MEK1, SEK1, MKK7, MKK3 und MKK6 und übernimmt somit prinzipiell eine regulatorische Rolle in allen bekannten MAP-Kinase-Signalwegen (Gotoh et al., 2001). Die Kinase MLTK wirkt pro-apoptotisch und partizipiert an der Zellzyklus-Kontrolle (Yang, 2002). Eine weitere nur nach HGF/SF-Stimulation beobachtete differentielle Regulation konnte an der Kinase MP2K6 beobachtet werden (Abb. III.37). MP2K6 ist auch unter dem Namen MKK6 (MAP Kinase Kinase 6) bekannt und zeigte im qualitativen Vergleich zwei Regulationsmaxima bei 1.4 und 2.3, wohingegen InlB₃₂₁ keinen Unterschied in der Proteinregulation hervorrief. MP2K6 ist als regulatorische Kinase des p38-MAP-Kinase-Weges beschrieben (Moriguchi et al., 1996; Cuenda et al., 1996; Raingeaud et al., 1996). Sowohl die differentielle Phosphorylierung an MLTK als auch die Proteinregulation an MP2K6 sind Hinweise darauf, dass HGF/SF im Vergleich zu InlB₃₂₁ den p38-MAP-Kinase-Signalweg beeinflusst. Die MAP-Kinase p38 (MAPK) wurde als Effektor der Kaskade aus MP2K6 (MAPKK) und MLTK (MAPKKK) beschrieben. Eine direkte Interaktion dieser drei Kinasen wurde ebenfalls gezeigt (Takahashi et al., 2003). Eine HGF/SF-stimulierte Aktivierung des p38-MAP-Kinasemoduls resultiert in der Aktivierung von NF- κ B, wodurch möglicherweise die zytoprotektive Wirkung von HGF/SF gegen DNA-Schädigung ausgelöst wird (Fan et al., 2007). Neben diesen beiden Kinasen des p38-MAP-Moduls wurden ebenfalls nur nach HGF/SF-Stimulation die beiden Proteine Prohibitin und Prohibitin2 als deutlich hochreguliert detektiert (Abb. III.38). Die Ursache für deren erhöhte Interaktion zu V16743 nach c-Met-Aktivierung liegt wahrscheinlich in einer HGF/SF-induzierten spezifischen Wechselwirkung zu V16743-affinen Kinasen, da Prohibitine keine Nukleotidbindungs-Stelle besitzen. Prohibitin wurde erstmals als Inhibitor der DNA-Synthese und somit als anti-proliferatives Protein identifiziert (Nuell et al., 1991; McClung et al., 1989). Die Tatsache, dass Prohibitin nur nach HGF/SF-, nicht aber nach InlB₃₂₁-Stimulation von c-Met als reguliert identifiziert wurde und ein regulatorischer Einfluss auf die DNA-Synthese beschrieben ist, könnte erklären, warum nur HGF/SF und natives InlB, nicht aber InlB₃₂₁ in der Lage sind, DNA-Synthese zu initiieren. Neben dem Einfluss auf DNA-Synthese können Prohibitine mit für Zellzyklus-Progression kritischen Transkriptionsfaktoren interagieren und weitere Funktionen an der Plasma-Membran und in Mitochondrien sind postuliert (Mishra et al., 2006).

Unter den hier gezeigten experimentellen Bedingungen stellte sich InIB₃₂₁ im Vergleich zum physiologischen Liganden HGF/SF als stärkerer Aktivator der c-Met Signalkaskade heraus (Abb. III.18A; Abb. III.32A). Aus diesem Blickpunkt betrachtet ist die spezifisch für HGF/SF beobachtete Modifikation der Kinasen des p38-Signalmoduls und der Prohibitine besonders hervorzuheben. Dies impliziert eine wichtige Rolle der Glykosaminoglykane in der zellulären Signaltransduktion. Möglicherweise ist im Vergleich zu InIB₃₂₁ nur HGF/SF durch Interaktion zu Glykosaminoglykanen in der Lage, für die Modulation der Prohibitine und des p38-Signalmoduls kritische c-Met-Korezeptoren zu rekrutieren. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der PI3-Kinase-Weg und der Ras-MAP-Kinase-Weg, welche durch InIB₃₂₁ deutlich stärker aktiviert wurden als durch HGF/SF, keine direkte Verbindung zu Prohibitinen darstellen.

Abschließend konnte in einem qualitativen Vergleich der Ergebnisse demonstriert werden, dass unter den gegebenen experimentellen Bedingungen neben den bereits bekannten und hier neu identifizierten gemeinsamen Effektoren von HGF/SF und InIB₃₂₁ auch Differenzen in der c-Met-vermittelten Signalantwort detektiert wurden. HGF/SF beeinflusst Kinasen des p38-MAP-Kinase-Moduls und Proteine der Prohibitin-Familie, wozu InIB₃₂₁ nicht in der Lage ist. Da InIB₃₂₁ im Vergleich zu HGF/SF nicht mit GAGs interagiert und beide Liganden eine unterschiedliche Aktivierungs-Kinetik von c-Met zeigen, sollte in zukünftigen Studien überprüft werden, ob konzentrations- und zeitabhängig natives InIB zur Modifikation der hier gezeigten spezifischen HGF/SF-Effektoren in der Lage ist. InIB₃₂₁ reprimiert eine Phosphorylierung der Kinase ROK2, welche somit ein für den *listeriellen* Virulenzfaktor spezifisches Effektor-Protein darstellt. ROK2 wurde bislang nur im Kontext von Zellproliferation untersucht und weitergehende Studien sollten klären, ob zusätzliche Funktionen von ROK2 an der *listeriellen* Invasion beteiligt sind.

V **Ausblick**

Die Tyrosinkinase c-Met reguliert wichtige Prozesse während der Embryonalentwicklung und der Organregeneration und eine Fehlsteuerung resultiert in vielen Fällen in der Entstehung von Krebs. Darüber hinaus induziert das human-pathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* durch Bindung des Virulenzfaktors InlB an c-Met seine Invasion in nicht-phagozytierende Zellen. Die c-Met-Signalkaskade steht aus diesen Gründen seit vielen Jahren im Mittelpunkt von Forschungsarbeiten. In der vorliegenden Arbeit konnten mit der Charakterisierung differentiell phosphorylierter Kinasen als Schlüsselproteine der Signalübertragung neue Komponenten der c-Met-Kaskade identifiziert werden. Einerseits ermöglichen die hier vorgestellten Ergebnisse in Zukunft eine Vervollständigung der molekularen Abläufe der von c-Met kontrollierten komplexen Prozesse. Andererseits bieten die Erkenntnisse aus infektionsbiologischer Sicht neue Ansatzpunkte zum tiefergehenden Verständnis der InlB-vermittelten Invasion von *Listeria monocytogenes* an.

Die von c-Met kontrollierten bekannten Phänotypen wie Motilität, Proliferation und - wie im Falle der InlB-Aktivierung - die *listerielle* Invasion stellen eine ideale Basis zur funktionellen Charakterisierung der neu identifizierten InlB- und HGF/SF-Effektorkinasen dar.

RNAi-Experimente sollten zunächst zeigen, ob Kinasen der MARK-Familie einen Einfluss auf die Infektionsrate von *Listeria monocytogenes* ausüben. Da in verschiedenen Zelltypen eine effiziente *listerielle* Invasion in Abhängigkeit der Integrität des Mikrotubuli-Systems gezeigt wurde und MARKs Mikrotubuli-Dynamik regulieren können, stellt diese Kinasefamilie eine potentielle Verbindung zwischen der InlB-aktivierten c-Met-Signalkaskade und der Invasion des Pathogens dar. Die detektierte differentielle Phosphorylierung deutet eine InlB-vermittelte Inhibierung der katalytischen Aktivität der MARKs an. In Kinase-Assays mit bekannten MARK-Substraten wie MAP2, MAP4 oder Tau sollte deshalb der Einfluss von InlB auf die Aktivität von MARKs detailliert untersucht werden. Aktivierte MARKs induzieren ebenfalls wie das Zellgift Nocodazol eine Destabilisierung von Mikrotubuli. Da Nocodazol die Invasionseffizienz von *Listeria monocytogenes* stark reduziert, sollte charakterisiert werden, ob eine Überexpression von konstitutiv aktiven MARKs ebenfalls die Aufnahmerate des Pathogens negativ beeinflusst.

Die Kinasen AMPK α -1 und Nek9 wurden sowohl nach HGF/SF- als auch nach InlB₃₂₁-vermittelter c-Met-Aktivierung differentiell phosphoryliert. Eine inhibitorische

Wirkung der hier identifizierten regulierten Phosphorylierung der katalytischen α -Untereinheit des heterotrimeren AMPK-Komplexes durch die Kinase Akt1(PKB) wurde bereits demonstriert. Zunächst sollte der Status und der zeitliche Verlauf der Aktivierung von AMPK in der c-Met-Signalkaskade beispielsweise über einen Phosphothreonin pT¹⁷²-spezifischen Antikörper untersucht werden. Eine Inhibierung des PI3-Kinase-Moduls durch Behandlung der Zellen mit LY294002 oder Wortmannin sollte zeigen, ob Akt1(PKB) die Modifikation von Serin S⁴⁸⁷ in der c-Met-Signalkaskade katalysiert. AMPK fungiert hauptsächlich als Energiesensor der Zelle und blockiert bei einem übermäßigem ATP-Verbrauch katabole Prozesse. Da die Zell-Proliferation einen ATP-verbrauchenden Prozess darstellt, ist eine kontrollierte Inhibierung von AMPK in der HGF/SF-aktivierten c-Met-Signalkaskade in bestimmten Phasen des Zellzyklus denkbar. Hierdurch würde ein vorzeitigen Abbruch der Zellzyklus-Progression aufgrund einer kurzfristigen Änderung des AMP:ATP-Verhältnisses vermieden werden. Diese Hypothese kann in HGF/SF-induzierten Proliferations-Assays untersucht werden. Der erst jüngst gezeigte Zusammenhang zwischen AMPK und dem Aktinzytoskelett lässt allerdings auch eine Rolle in der Zellmotilität und darüber hinaus in der *listeriellen* Invasion vermuten, was durch Scatter- und Infektionsassay untersucht werden sollte.

Der Kinase Nek9 kommt in zukünftigen Analysen eine besondere Aufmerksamkeit zu. Die Modifikation an Threonin T³³³ zählte in der vorliegenden Dissertation zu den stärksten und konsistentesten Phosphorylierungen nach Aktivierung der c-Met-Signalkaskade. Aufbauend auf initialen Experimenten konnte bereits eine erste Hypothese zu Nek9 im c-Met-Signalweg erstellt werden. Threonin T³³³ ist möglicherweise ein essentielles Kontrollelement zur Relokalisation von cytosolischem Nek9 in den Zellkern. Fluoreszenz-mikroskopische Studien mit GFP-markiertem Nek9 sollten zunächst einen Einfluss von InlB und HGF/SF auf die zelluläre Verteilung dieser Kinase demonstrieren. Darüber hinaus sollten Mutations-Studien mit T333A- bzw. T333D-Varianten zeigen, ob und in welchem Maße die Phosphorylierung an Threonin T³³³ die Lokalisation von Nek9 durch eine mögliche Demaskierung der Kernlokalisations-Sequenz beeinflusst. Als äußerst aufschlussreich werden Studien zum Aktivitäts-Status von Nek9 in der c-Met-Signalkaskade sein. Mittels eines Phosphothreonin pT²¹⁰-spezifischen Antikörpers bzw. in Kinase-Assays sollte demonstriert werden, ob c-Met eine Autophosphorylierung und hierdurch eine Aktivierung von Nek9 induziert. Hierbei ist besonders interessant, ob die Phosphorylierung an Threonin T³³³ durch Steuerung möglicher intramolekularer Interaktionen für die Aktivierung essentiell ist. Eine weitergehende Validierung der hier gezeigten MAP-Kinase-Abhängigkeit der Threonin T³³³-Modifikation wird in einer exakten Zuordnung der verantwortlichen Kinase resultieren. Da Nek9 als mitotische

Kinase beschrieben ist, sollte demonstriert werden, ob c-Met über Nek9 Proliferation induziert. In der vorliegenden Arbeit konnten für Nek9 erstmals Komponenten des Aktinzytoskeletts, sowie der c-Met-Korezeptor CD44 und Proteine der ERM-Familie als potentielle Interaktionspartner von Nek9 erfasst werden, wodurch sich neue Ansätze zur Aufklärung der bislang unbekannten Funktion von Nek9 im Cytosol der Zelle ergeben. In weitergehenden Analysen sollten deshalb direkte Interaktionspartner von Nek9 exakt bestimmt und die Auswirkung von c-Met sowohl nach InlB- als auch nach HGF/SF-Aktivierung auf mögliche Proteinkomplexe analysiert werden. Konsequenterweise sollte darüber hinaus untersucht werden, ob Nek9 einen Einfluss auf die Aktindynamik und somit auf die *listerielle* Invasion bzw. die HGF/SF-gesteuerte Zellmotilität ausübt.

RIOK2 wurde in der vorliegenden Arbeit als spezifische Effektorkinase von InlB₃₂₁ identifiziert. Weiterhin wurde demonstriert, dass unter gegebenen experimentellen Bedingungen nur HGF/SF in der Lage ist, eine Modifikation von Kinasen des p38-MAP-Signalweges sowie der Prohibitine zu induzieren. Diese Ergebnisse können in Zukunft zur Beantwortung der Frage beitragen, ob InlB die HGF/SF-induzierte c-Met-Signalkaskade vollständig nachahmt. Hierfür sind allerdings weitere Experimente notwendig. Diese sollten zeigen, ob natives InlB die Kinasen MLTK und MKK6 des p38-Moduls beeinflusst bzw. ob HGF/SF zeit- und konzentrationsabhängig vergleichbar zu InlB₃₂₁ die Phosphorylierung von Serin S³⁵⁰ der Kinase RIOK2 reprimiert. Wirkt sich eine InlB-Stimulation auf Komponenten des p38-MAP-Signalweges in ähnlicher Weise zu HGF/SF aus, so würde sich die Frage nach dem Einfluss der GW-Module auf die Aktivierung von c-Met bzw. von Ko-Rezeptoren ergeben.

Mit der Identifizierung neuer Komponenten des c-Met-Signalweges konnte eindrucksvoll das Potential des in dieser Arbeit etablierten Konzeptes der quantitativen Phosphokinom-Analyse gezeigt werden. In proteomischen Ansätzen wurden bislang meist Subproteome wie Proteine aus Membranfraktionen, des Zytoplasmas oder des Zellkerns analysiert, die sich aufgrund ihrer biophysikalischen Eigenschaften anreichern lassen. Im Gegensatz hierzu wurde mit dem vorgestellten Ansatz die erfolgreiche Anreicherung von Proteinen nach funktionellen Gesichtspunkten demonstriert. Zum Einen lässt sich in Zukunft das Konzept der Familie-selektiven aber Typ-unspezifischen Affinitäts-Chromatographie durch den Einsatz zu V16743 komplementärer ATP-kompetitiver Kinase-Inhibitoren erweitern. Hierdurch wird ein noch umfassenderer Anteil dieser Enzymfamilie für eine biochemische Analyse zugänglich, wobei neben der Charakterisierung differentieller Phosphorylierungen an Kinasen in Zukunft eine Untersuchung zusätzlicher posttranslationaler Modifikationen wie beispielsweise der Ubiquitinierung oder der

Modifikation durch Membrananker (Prenylierung, Farnesylierung, etc.) erfolgen sollte. Zum Anderen sollte dieses Konzept auf weitere funktionelle Proteinklassen ausgebaut werden. Denkbar wäre konsequenterweise eine Affinitäts-chromatographische Reinigung von Phosphatasen über immobilisierte Phosphatase-Inhibitoren wie beispielsweise Calyculin oder Microcystin. Ein solcher Ansatz wird deren systematische biochemische Charakterisierung ermöglichen und zu einer Vervollständigung unseres Wissens über die molekularen Abläufe in bereits gut untersuchten Signalkaskaden beitragen. Da Phosphatasen und Kinasen die reversible Substrat-Phosphorylierung steuern, wird durch die detaillierte Charakterisierung beider Proteinklassen die Rolle der Phosphorylierung als regulatorisches Element in Signalkaskaden besser verstanden werden.

Die zeitlich aufgelöste Quantifizierung von Phosphorylierungen wird zukünftig eine wichtige Rolle in der Analyse von Signalkaskaden übernehmen. Durch iTRAQ™ ist mittlerweile ein Vergleich von bis zu acht unterschiedlichen Zeitpunkten möglich, wodurch in Kombination mit der selektiven Reinigung spezifischer Signalproteine wie Kinasen ein hierarchisches Netzwerk dieser Komponenten in der Signalübertragung erstellt werden kann. Dies erfordert die Anpassung geeigneter Analyse-Programme für die Auswertung quantitativer massenspektrometrischer Daten über acht Konditionen aus einem Spektrum. Die in der vorliegenden Dissertation gezeigte Quantifizierung posttranslationaler Phosphorylierungen in Kombination mit der Proteinklasse-selektiven Affinitäts-Chromatographie ist prinzipiell zur Analyse verschiedenster pathologisch relevanter Signalwege geeignet und wird in Zukunft die detaillierte Untersuchung von Modifikationen an bedeutenden Signalproteinen erleichtern.

VI Zusammenfassung

Das human-pathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* instrumentalisiert die c-Met-Signalkaskade, um seine Invasion in unterschiedliche Zelltypen zu induzieren. Der Virulenzfaktor InlB bindet und aktiviert die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met, wodurch die nachfolgende Signalübertragung in einer komplexen Reorganisation des Aktinzytoskeletts und der Reißverschluss-artigen Aufnahme des Pathogens resultiert. Kinasen nehmen eine fundamentale Rolle in der Spezifität von Signalkaskaden ein. Mit über 500 Mitgliedern zählen Kinasen zu einer der größten im humanen Genom kodierten Proteinfamilien.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Dissertation stand die systematische Identifizierung von Kinasen in der InlB-vermittelten Wirt-Pathogen-Interaktion von *Listeria monocytogenes*. Hierfür wurde erstmals eine Affinitäts-chromatographische Reinigung von Kinasen mit der Identifizierung und Quantifizierung von Phosphorylierungs-Stellen durch gel-freie Methoden der Massenspektrometrie kombiniert. Das auf Basis des ATP-kompetitiven Kinase-Inhibitor PP58 entwickelte Molekül V16743 stellte sich als eine der aktuell Typ-unspezifischsten Kinase-selektiven Affinitätsmatrices dar. Das Substrat-Spektrum von V16743 umfasste über 100 Kinasen aus nahezu allen Familien des humanen Kinoms, weshalb sich dieses Affinitätsmaterial als ideale Basis zur systematischen biochemischen Charakterisierung der Kinase-Familie herausstellte. Eine nachfolgende HPLC-MS/MS-gestützte Analyse von Phosphorylierungen konnte erfolgreich zur Identifizierung von insgesamt 231 nicht-redundanten Phosphorylierungs-Stellen an V16743-affinen Proteinen eingesetzt werden. 166 dieser Modifikationen konnten zur Protein-Familie der Kinasen zugeordnet werden. Ein umfassender Datenbank-Abgleich offenbarte 68 neue Phosphorylierungen an Kinasen, die durch Mutationsanalysen im Hinblick auf deren regulatorische Funktion für die enzymatische Aktivität in zukünftigen Arbeiten untersucht werden können.

Durch die in dieser Arbeit etablierte experimentelle Strategie wurde die proteomische Charakterisierung von äußerst frühen Veränderungen am Phosphorylierungs-Muster von Kinasen in der c-Met-Signalkaskade ermöglicht. Die quantitative Phosphokinom-Analyse führte zur Identifizierung von InlB-abhängig regulierten Phosphorylierungen an Kinasen des MAP-Kinase-Moduls und des PI3K-Signalweges. Eine Validierung dieser Ergebnisse durch Westernblot-Analysen mit spezifischen Antikörpern unterstreicht die Funktionalität des vorgestellten Konzepts. Darüber hinaus konnten neun weitere Kinasen als InlB₃₂₁-abhängig differentiell phosphoryliert identifiziert

werden, wodurch eine Basis für zukünftige funktionelle Analysen der *listeriellen* Wirt-Pathogen-Interaktion geschaffen wurde. Neben der Charakterisierung von RIOK2 als InlB₃₂₁-spezifisch modifizierte Kinase wurden Komponenten des p38-MAP-Kinaseweges und Proteine der Prohibitin-Familie als HGF/SF-spezifische Effektoren identifiziert.

Die Serin/Threonin-Kinase Nek9 stellte sich erstmals in dieser Arbeit als fundamentale Komponente der c-Met-Signalkaskade heraus. Eine Phosphorylierung an Threonin T³³³ wurde sowohl durch den *listeriellen* Virulenzfaktor InlB₃₂₁ wie auch durch den physiologischen Liganden HGF/SF induziert. Initiale Studien konnten die Threonin T³³³-Phosphorylierung zum MAP-Kinase-Modul zuordnen. Zudem schlägt die Identifizierung von ko-präzipitierenden Proteinen zytoplasmatisches Nek9 als direkten oder indirekten Bindungspartner von Aktin und bekannten Aktin-assoziierten Proteinen vor. Eine mögliche Funktion der Modifikation an Threonin T³³³ könnte in der Demaskierung der intramolekularen Kernlokalisations-Sequenz liegen. In der vorliegenden Studie wurden erste Hinweise erarbeitet, die zur Hypothese einer c-Met-gesteuerten und Phosphothreonin pT³³³-abhängigen Translokation von Nek9 in den Zellkern führen und in zukünftigen Experimenten validiert werden sollten.

VII Material und Methoden

1. Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Tab. VII.1: Allgemeine Chemikalien und Reagenzien.

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
Tween® 20	9127.2	Roth
Trizma® base ≥99.9% (Tris)	T1503	Sigma
Triton® X-100	T9284	Sigma
Trifluor-Essigsäure ≥99.5% (TFA)	91699	Fluka
Triethylammonium Bicarbonat Puffer p.A. for HPLC (TEAB)	17902	Fluka
TEMED 99% p.A.	2367.3	Roth
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	P5726	Sigma
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	P2850	Sigma
Natriumfluorid 99.99 Suprapur® (NaF)	106450	Merck
Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	1610302	Biorad
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Na ₂ HPO ₄)	106346	Merck
Natriumchlorid ≥99.5% p.A. (NaCl)	3957.1	Roth
Natrium Orthovanadat ≥90% (Na ₃ VO ₄)	S6508	Sigma
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid hydrochlorid ≥98% (EDC-HCl)	3450	Fluka
Magnesiumchlorid Biochemika Ultra Hexahydrat ≥99%		Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat ≥99% p.A. (KH ₂ PO ₄)	3904.1	Roth
Kaliumchlorid ≥99.5% p.A.	6781.1	Roth
Igepal® CA-630 (für Molekularbiologie)	I8896	Sigma
HEPES ≥99.5%	H3375	Sigma
Glycin Pufferan® ≥ 99% p.A.	3908.2	Roth
Glycerin ~87% p.A.	104094	Merck
Ethanolamin ReagentPlus® ≥99%	110167	Sigma
Essigsäure 100% Rotipuran® p.A.	3738.5	Roth
Complete Protease Inhibitor Cocktail	11697498001	Roche
Complete Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-frei	11873580001	Roche
Calyculin A ≥98%	C-3987	LC Laboratories
Bromphenolblau	17-1329-01	GE Healthcare
Ammoniumphosphat ≥98% (APS)	A-1292	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat <i>analytical grade</i> (APS)	13375	Serva
Ammoniumbicarbonat Biochemika Ultra, ≥ 99.5% (NH ₄ HCO ₃)	09830	Fluka
Ameisensäure ~98%	94318	Fluka
Albumin Rinderserum ≥ 98% (BSA)	A7906	Sigma
2-Mercaptoethanol	M7154	Sigma
2-Iodacetamid (IAA)	804744	Merck
1,4-Dithiothreitol ≥99% (DTT)	4010	Biomol

Na₃VO₄ (Stocklösung)

0.2M

Nach Einwiegen und Lösen in ddH₂O wurde der pH-Wert mit 16%iger HCl auf 10 justiert und die Lösung bis zum Klarwerden aufgeköcht. Nach Abkühlen wurde die Stocklösung aliquotiert und bis zum Einsatz bei -20 °C gelagert.

NaF (Stocklösung)

0.5M

Nach Einwiegen und Lösen unter Wärmezufuhr in ddH₂O wurde die Stocklösung aliquotiert und bis zum Einsatz bei -20 °C gelagert.

Lösungen und Puffer sind in den einzelnen Kapiteln angegeben. Mit Ausnahme des Elektrodenpuffers, des 4xSDS-Probenpuffers, des Tankblot-Puffers, der Fixier- und der Coomassie Fast-Silver Färbelösung wurden sämtliche Lösungen und Puffer in deionisiertem Wasser angesetzt, welches über das membraPure-System (Astacus) aufbereitet wurde (ddH₂O). Soweit angegeben, wurde der pH-Wert eines Puffers mit 16%iger HCl, konzentrierter HCl, 1M NaOH, Ammoniak, konzentrierter Essigsäure oder 2%iger Trifluor-Essigsäure an einem pH-Meter 763 Multi-Calimatic (Knick Elektronische Messgeräte) mit einer Inlab423-pH-Elektrode (Mettler-Toledo) eingestellt. Falls weder Säure noch Base angegeben wurde, war eine Einstellung des pH-Wertes nicht erforderlich.

N,N-Dimethylformamid (#40258, DMF), Methanol (#8045, MeOH), Ethanol (#8006, EtOH), Chloroform (#7386, CHCl₃) und Acetonitril (#9017, ACN) wurden in p.A.-Reinheit von J.T. Baker bezogen.

2. Allgemeine biochemische Methoden

A. SDS-PAGE

Die eindimensionale Proteintrennung nach Größe erfolgte nach Laemmli (Lämmli, 1970) im Minigel-System von Biometra (86x77x1mm). Die zu trennenden Proteinproben wurden in 4xSDS-Probenpuffer für zehn Minuten bei 80 °C erwärmt, unlösliche Bestandteile für drei Minuten bei 16.000 xg pelletiert und die Proben in die Geltaschen überführt. Als Molekulargewichts-Standard wurde die PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, #SM0671, Trennbereich ~10 bis ~170kDa) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Elektrodenpuffer. Die Proben liefen bei 120V in das Sammelgel ein, die Auftrennung im Trenngel erfolgte bei 160V.

Sammelgel (Angaben für zwei Mini-Gele)

ddH ₂ O	6,1ml
Tris (0.5M, pH 6,8, 16%ige HCl)	2,5ml
Acrylamid/Bis (37,5:1)	1,5ml
SDS (10%)	100µl
TEMED	50µl
APS (10%)	75µl

Trenngel (Angaben für 2 Mini-Gele):	7,5%	10%	12%
ddH ₂ O	7,4ml	6,1ml	5,1ml
Tris-Base (1.5M, pH 8,8, 16%igeHCl)	3,8ml	3,8ml	3,8ml
Acrylamid/Bis (37,5:1)	3,8ml	5ml	6ml
SDS (10%)	150µl	150µl	150µl
TEMED	20µl	20µl	20µl
APS (10%)	50µl	50µl	50µl

Elektrodenpuffer (pH 8.9) 10x

Glycin	2M
Tris-Base	0.25M
SDS	35mM

4xSDS-Probenpuffer

Tris-Base (pH6.8, 16%ige HCl)	0.24M
Glycerin	40% (v/v)
2-Mercaptoethanol	12% (v/v)
SDS	0.27M
Bromphenolblau	0.004% (w/v)

B. Proteinfärbung

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Minigele zweimal 30 Minuten in Fixierlösung fixiert, zweimal zehn Minuten in deionisiertem Wasser gewaschen und in Coomassie Fast-Silver (Candiano et al., 2004) über Nacht gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in deionisiertem Wasser. An einem Durchlichtscanner (PowerLookIII, UMAX) wurden die Gele digitalisiert.

Fixierlösung

EtOH	30% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

Coomassie Fast-Silver Färbelösung

MeOH	20% (v/v)
H ₃ PO ₄ (85%)	10% (v/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	10% (w/v)
Coomassie BB-G-250	0.12% (w/v)

C. Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe erfolgte mit dem Biorad Protein-Assay (#500-0006, Biorad) nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Ein Aliquot der zu untersuchenden Probe wurde in verschiedenen Verhältnissen mit ddH₂O verdünnt (meist 1:5, 1:10 und 1:15). In einer Dreifachmessung wurden je Verdünnungsstufe dreimal 10 µl Probe mit 200 µl der 1:5 in ddH₂O verdünnten Protein-Assay-Reagenz vermischt. Die Extinktion wurde in Mikrotiter-Platten bei einer Wellenlänge von 595 nm (Infinite M200, Tecan GmbH) bestimmt und anhand einer BSA-Kalibrierung in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

D. Tankblot-Transfer

Der Proteintransfer aus dem Minigel auf eine PVDF-Membran (Immuno-Blot™ PVDF Membran, 0.2 µm, #162-0177, Biorad) erfolgte nach dem Tankblot-Verfahren. Hierfür wurden die Minigele nach Beendigung der Elektrophorese zweimal fünf Minuten in 1x Tankblot-Puffer äquilibriert. Die auf Gelgröße angepassten PVDF-Membranen wurden fünf Minuten in MeOH aktiviert und fünf Minuten in 1x Tankblot-Puffer gewaschen. Das verwendete Whatman-Papier (Biorad) wurde ebenfalls in 1x Tankblot-Puffer äquilibriert. Der Aufbau von Gel, Membran und Whatman-Papier erfolgte luftblasen-frei in einem Haltekäfig des Anderson IsoDalt Elektrophorese-Tanks (Hoefer Scientific Instruments). Der Tankblot erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 8 °C unter ständiger Puffer-Umwälzung bei 200 V (PowerSupply Hoefer EPS 2A200) für 2.5 Stunden.

Tankblot-Puffer 10x

Glycin	0.4M
Tris	0.2M
SDS	17mM

Tankblot-Puffer 1x

Tankblot-Puffer	1x
MeOH	20% (v/v)

Nach Beenden des Transfers erfolgte die immunologische Charakterisierung der Proteine wie im nächsten Kapitel (VII.2.E.) beschrieben.

E. Antikörper und Immunodetektion

Nach dem Tankblot-Transfer wurden PVDF-Membranen für 60min bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch in Blockierlösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem gewünschten Primär-Antikörper in angegebener Verdünnung (Tab. VII.2) in Blockierlösung bei 4°C über Nacht auf einem Schwenktisch. Am nächsten Tag wurden die PVDF-Membranen je zehn Minuten in TBS-T, TBS-T/NaCl, TBS-T/Triton X-100 und TBS-T gewaschen und mit dem passenden Sekundär-Antikörper in angegebener Verdünnung (Tab. VII.3) in Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch inkubiert. Abschließend wurden die Membranen dreimal zehn Minuten in TBS-T gewaschen. Die Detektion des HRP-katalysierten Chemilumineszenz-Signales erfolgte nach Substrat-Zugabe (Lumi-Light Western Blotting Substrat, Roche Diagnostics) mit einer CCD-Kamera (Fujifilm LAS3000, Raytest). Die Quantifizierung von Chemilumineszenz-Signalen wurde densitometrisch mit dem Bildbearbeitungsprogramm AIDA Image Analyzer V4.06.034 (Raytest) durchgeführt.

Sollten auf einer Membran nacheinander mehrere Primär-Antikörper eingesetzt werden, so wurde nach Detektion eines Chemilumineszenz-Signales die PVDF-Membran für je zehn Minuten in Puffer A und Puffer B (Antikörper-Desorption) am Schwenktisch gewaschen, um gebundene Sekundär-Antikörper zu entfernen. Nach einem weiteren 60minütigen Blockier-Schritt in Blockierlösung konnte die Membran erneut mit einem Primär-Antikörper inkubiert werden.

Tab. VII.2A: Primär-Antikörper

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung WB	Bestell-Nummer	Hersteller
Phospho-Met (Tyr1234/1235)	polyklonal, Kaninchen	1:1000	3126	Cell Signaling Technology
Phospho-Mek1/2 (Ser217/221)	polyklonal, Kaninchen	1:1000	9121	Cell Signaling Technology
Phospho-GSK- 3 α / β (Ser21/9)	polyklonal, Kaninchen	1:1000	9331	Cell Signaling Technology
Phospho-Akt (Ser473) (587F11)	monoklonal, Maus IgG2b	1:1000	4051	Cell Signaling Technology
Phospho-p44/42 MAPK (Thr201/Tyr203) E10	monoklonal, Maus IgG1	1:2000	9106	Cell Signaling Technology

Tab. VII.2B: Primär-Antikörper

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung WB	Bestell-Nummer	Hersteller
Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrat Antikörper	polyklonal, Kaninchen	Immunopräzipitation	9611	Cell Signaling Technology
Anti-Actin (20-33)	polyklonal, Kaninchen IgG Fraktion	1:1000	A5060	Sigma
Anti-Nek9 pAB (A01)	polyklonal, Maus-Serum	1:1000	H00091754- A01	Abnova Corp.
Met (C-12)	polyklonal, Kaninchen IgG Fraktion	1:1000	Sc-10	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Tab. VII.3: Sekundär-Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
A4a	Ziege- α -Maus IgG/IgM	Peroxidase (HRP)	1:2000	Dianova
B4c	Ziege- α -Kaninchen IgG/IgM	Peroxidase (HRP)	1:2000	Dianova

TBS (pH 7.5) 10x

Tris

0.2M

NaCl

1.37M

TBS-T

TBS

1x

Tween 20

0.1% (v/v)

TBS-T/NaCl

TBS-T

NaCl

0.5M

TBS-T/Triton X-100

TBS-T

Triton X-100

0.5%

Blockierlösung

TBS-T

BSA

5% (w/v)

Antikörper-Desorption

Puffer A (pH 2, 16%ige HCl)

Glycin 0.2M

NaCl 0.5M

Puffer B (pH 11, NaOH)

Tris-Base 0.5M

3. Zellbiologische Arbeiten

A. Zelllinien und Medien

Tab. VII.4: In dieser Arbeit verwendete Zell-Linien.

Bezeichnung	ATCC®-Nummer	Spezies	Herkunft (Erkrankung/Organ)	Morphologie
HeLa S3	CCI-2.2	Human	Adenokarzinom (Gebärmutterhals)	Epithelial, adhärent
DU-145	HTB-81	Human	Karzinom (Prostata, Hirn-Metastase)	Epithelial, adhärent

Standard-Medium HeLa S3:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, 1g/L Glucose, 110mg/L Natrium-Pyruvat, #31885, Gibco Invitrogen) wurde mit 10% Fötalem Kälberserum (FBS Gold, #A15151, PAA Laboratories GmbH), 2mM L-Glutamin (#25030, Gibco Invitrogen), 50.000 E/L Penicillin und 50mg/L Streptomycin (#15070-063, Gibco Invitrogen) versetzt.

Minimal-Medium HeLa S3:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, 1g/L Glucose, 110mg/L Natrium-Pyruvat, #31885, Gibco Invitrogen) ohne Zusätze.

Standard-Medium DU-145:

1x RPMI 1640 (L-Glutamin, #21875, Gibco Invitrogen) wurde mit 10% Fötalem Kälberserum (FBS Gold, #A15151, PAA Laboratories GmbH), 2mM L-Glutamin (#25030, Gibco Invitrogen), 50.000 E/L Penicillin und 50mg/L Streptomycin (#15070-063, Gibco Invitrogen) versetzt.

Minimal-Medium DU-145:

1x RPMI 1640 (L-Glutamin, #21875, Gibco Invitrogen) ohne Zusätze.

B. Passagieren von Zelllinien

HeLa S3 und DU-145-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80% im jeweiligen Standard-Medium bei 37°C und 7.5% CO₂-Gehalt in einem Inkubator (Innova CO-170, New Brunswick Scientific) auf 10cm-Zellkulturschalen (#430167, Corning) angezogen. Nach zweimaligem Waschen mit vorgewärmten PBS wurden die adhärennten Zellen durch Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung (#25300, Gibco Invitrogen) von der Schale abgelöst. Anschließend wurde Trypsin durch Zugabe von Standard-Medium deaktiviert. Nach Pelletierung bei 200 xg für drei Minuten wurden die Zellen in Standard-Medium aufgenommen und für die Zellkultur-Haltung in einer 1:10-Verdünnung auf neue Schalen ausgebracht.

PBS (pH 7.3)

NaCl	137mM
KCl	2,7mM
Na ₂ HPO ₄	4.3mM
KH ₂ PO ₄	1.4mM

C. Lagerung von Zelllinien

Zur Langzeit-Lagerung von Zellen wurden diese bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80% durch Zugabe von Trypsin abgelöst, pelletiert und in Standard-Medium resuspendiert (Kapitel VII.3.B.). Nach Bestimmung der Zellzahl durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer wurde die Konzentration mit Standard-Medium auf $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Durch anschließendes Verdünnen der Zellsuspension mit einer 20%igen DMSO-Lösung in Standard-Medium wurde eine Endkonzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml und 10% DMSO eingestellt. Die so hergestellte Zellsuspension wurde in 1ml-Aliquots in Cryo-Röhrchen (Cryotube Vial, Nunc) überführt und in einem Isopropanol-gefülltem Cryo-Container (Nalgene) über Nacht bei -70° gelagert. Am nächsten Tag wurden die Cryo-Röhrchen zur Langzeit-Einlagerung in die Gasphase eines mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tanks überführt.

Bei Bedarf wurden Cryo-Röhrchen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension langsam mit vorgewärmten Standard-Medium verdünnt. Nach

Pelletierung und einem Waschschrift in Standard-Medium wurden die Zellen auf 10cm-Schalen ausgebracht und im Brutschrank angezogen.

4. Rekombinante Proteine

A. InlB₃₂₁

Die in dieser Arbeit eingesetzte Variante von Internalin B besteht aus der N-terminalen Cap-Domäne, den Leucin-reichen Sequenzen und dem C-terminal folgenden Interrepeat und umfasst die Aminosäuren 36 bis 321 (Bezeichnung: InlB₃₂₁). Die Expression und Aufreinigung des rekombinanten InlB₃₂₁ erfolgte im pGEX-6P-1-Vektor-System als GST-Fusionsprotein nach der Beschreibung in der Diplomarbeit von Tobias Reinl (Reinl, 2004) und wird hier kurz zusammengefasst: das von der Abteilung Strukturbioogie (Prof. Dr. D. Heinz, HZI) zur Verfügung gestellte Vektorkonstrukt pGEX-6P-1-*inlb*₃₂₁ (Schubert et al., 2001) umfasste die DNA-Sequenz für das Protein InlB₃₆₋₃₂₁. Die Transformation des Vektors erfolgte in kompetente *E.coli* BL21-Zellen. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.8 wurde durch Zugabe von 0.1mM IPTG (Endkonzentration) die *tac*-Promotor-abhängige Proteinexpression induziert. Nach Ernte wurden die Zellen durch einen dreifachen Zyklus in einer French-Press bei 1500 PSI aufgeschlossen. Der das lösliche GST-InlB₃₂₁-Fusionsprotein enthaltende Überstand wurde mit Glutathion-Sepharose 4B inkubiert. Nach ausführlichen Wasch-Schritten wurde durch Zugabe von PrecisionProtease der GST-Anteil vom Fusionsprotein abverdaut. Das native InlB₃₂₁ wurde anschließend über eine MonoQ-Anionenaustausch-Säule nachgereinigt. Proteinreiche Fraktionen wurden gelelektrophoretisch überprüft, vereint und gegen PBS dialysiert. Nach Sterilfiltration wurde InlB₃₂₁ aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Stabilität des Proteins während der Langzeit-Lagerung wurde vor den einzelnen Experimenten gelelektrophoretisch kontrolliert. Abbauprodukte konnten nicht festgestellt werden.

Aminosäure-Sequenz von InlB₃₂₁ (Einbuchstaben-Code):

ETITVPTPIKQIFSDDAFAETIKDNLKKKSVTDAVTQNELNS
IDQIIANNSDIKSVQGIQYLPNVTKLFLNGNKLTDIKPLANL
KNLGWLFLENKVKDLSSLKDLKKLKSLSLEHNGISDINGL
VHLPQLESLLYLGNNKITDITVLSRLTKLDTLSLEDNQISDIV
PLAGLTKLQNLVLSKNHISDLRALAGLKNLDVLELFSQECL
NKPINHQS NLVVPNTVKNTDGS LVTPEIISDDGDYEKPNV
KWHLP EFTNEVS FIFYQPVTIGKAKARFHGRVTQPLKE

Molekulargewicht: 31947Da

B. InlB₃₂₁/StrepIIIC WT und InlB₃₂₁/StrepIIIC LoF

Fünf aromatische Aminosäuren in den Leucin-reichen Sequenzen von InlB sind essentiell für die Interaktion von InlB zu c-Met. Ein Austausch dieser fünf Aminosäuren gegen Serin verhindert, dass InlB an c-Met binden und die Kinase-Domäne von c-Met aktivieren kann (Machner et al., 2003). In dieser Arbeit wurde eine quantitative Phosphokinom-Studie nach Induktion mit InlB₃₂₁ WT (Wild Type) im Vergleich zur Induktion mit dem die fünf Mutationen tragenden InlB₃₂₁ LoF (Loss of Function) durchgeführt. Beide Proteine wurden als C-terminal markierte StrepTagII-Fusionsproteine (Schmidt et al., 1996) rekombinant hergestellt (Bezeichnung: InlB₃₂₁/StrepIIIC WT und InlB₃₂₁/StrepIIIC LoF). Die Klonierung, Expression und Reinigung der beiden InlB₃₂₁-Varianten wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit betreut und erfolgte in der Diplomarbeit von Stefan Muschal (Muschal, 2006). Als Ausgangs-Vektor für die Variante InlB₃₂₁/StrepIIIC WT wurde der pGEX-6P-1-*inlB*₃₂₁-Vektor verwendet. Die Gensequenz für InlB₃₂₁/StrepIIIC LoF lag in dem Vektor pMMP_NdeI vor und wurde von der Abteilung Strukturbioogie (Prof. Dr. D. Heinz, HZI) zur Verfügung gestellt. Durch die Wahl der Primer wurden die DNA-Sequenzen des Wildtyp-InlB₃₂₁ und des LoF-InlB₃₂₁ über PCR aus den Ausgangsvektoren amplifiziert und mit BsaI-Schnittstellen versehen. Der Zielvektor pASK-IBA3-Plus (IBA GmbH, Göttingen) und die PCR-Produkte wurden mit BsaI geschnitten. Nach Ligation der beiden InlB₃₂₁-DNA-Sequenzen in pASK-IBA3-Plus erfolgte die Transformation in *E.coli* BL21. Die *tet*-Promotor-abhängige Expression wurde durch Zugabe von Anhydrotetracyclin gestartet. Nach Zellernte und Aufschluss durch dreimaligen Zyklus in einer FrenchPress bei 1500 PSI wurde der Überstand mit Strep-Tactin-Sepharose inkubiert. Die C-terminalen StrepTag II-Fusionsproteine InlB₃₂₁/StrepIIIC WT und InlB₃₂₁/StrepIIIC LoF wurden nach ausführlichen Waschschritten durch Zugabe von Desthiobiotin eluiert und über eine MonoQ-Anionenaustausch-Säule nachgereinigt. Proteinreiche Fraktionen wurden gelelektrophoretisch überprüft, vereint und gegen PBS dialysiert. Nach Sterilfiltration wurden die Proteine aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Stabilität der Proteine während der Langzeit-Lagerung wurde vor den einzelnen Experimenten gelelektrophoretisch kontrolliert. Abbauprodukte konnten nicht festgestellt werden.

Eine Sequenzierung der in den Zielvektor pASK-IBA3-Plus eingebrachten Sequenzen für InlB₃₂₁/StrepIIIC WT und InlB₃₂₁/StrepIIIC LoF zeigte, dass das WT-Protein fehlerfrei kloniert werden konnte. In der LoF-Variante wurden durch Sequenzierung der zu den fünf Aminosäure-Mutationen führende Basenaustausch bestätigt. Zusätzlich wurden während der Klonierung des LoF-InlB₃₂₁ zwei unerwünschte Basen-Mutationen eingeführt, die zu einem Austausch von Isoleucin I⁴⁴ zu Threonin und Alanin A²²⁷ zu Valin führten. Eine Modellierung zeigte, dass die beiden

letztgenannten Mutationen außerhalb der Kontaktstellen von InIB zu c-Met liegen (Dr. H. Niemann, Abteilung Strukturbiologie Prof. Dr. D. Heinz, HZI).

Aminosäure-Sequenz von InIB_{321/StrepIIc} WT (Einbuch-staben-Code):

ETITVPTPIKQIFSDDAFAETIKDNLKKKSVTDAVTQNELNS
IDQIIANNSDIKSVQGIQYLPNVTKLFLNGNKLTDIKPLANL
KNLGWLFLDENKVKDLSSSLKDLKKLKSLSLEHNGISDINGL
VHLPQLESPLYLGNNKITDITVLSRLTKLDTLSLEDNQISDIV
PLAGLTKLQNLVLSKNHISDLRALAGLKNLDVLELFSQECL
NKPINHQS NLVVPNTVKNTDGS LVTPEIISDDGDYEKPNV
KWHLPEFTNEVSFIFYQPVTIGKAKARFHGRVTQPLKE **SA**
WSHPQFEK

Molekulargewicht: 33145Da

Aminosäure-Sequenz von InIB_{321/StrepIIc} LoF (Einbuch-staben-Code):

ETITVPTPT **T**KQIFSDDAFAETIKDNLKKKSVTDAVTQNELN
SIDQIIANNSDIKSVQGIQYLPNVTKL **S**LNGNKLTDIKPLAN
LKNLG **S****S**LDENKVKDLSSSLKDLKKLKSLSLEHNGISDING
LVHLPQLES **L****S**LGNNKITDITVLSRLTKLDTLSLEDNQISDI
VPLAGLTKLQNL **S**LSKNHISDLRAL **V**GLKNLDVLELFSQEC
LNKPINHQS NLVVPNTVKNTDGS LVTPEIISDDGDYEKPNV
KWHLPEFTNEVSFIFYQPVTIGKAKARFHGRVTQPLKE **SA**
WSHPQFEK

Molekulargewicht: 32789Da

BLAU:	Der gezielte Austausch der gezeigten fünf aromatischen Aminosäuren zu Serin verhindert die InIB ₃₂₁ -Interaktion zu c-Met (F104S, W124S, F126S, Y170S, Y214S)
ROT:	während der Klonierung entstandene Mutationen (I44T, A227V), die außerhalb der InIB-c-Met-Interaktionsfläche liegen
VIOLETT:	während der Klonierung entstandene stille Mutation (L169L)
GRAU:	pASK-IBA3-Plus kodierter Linker (SA)
GRÜN:	pASK-IBA3-Plus-kodierter C-terminaler StrepTagII (WSHPQFEK)

Nach Trennung der beiden InIB-Varianten InIB_{321/StrepIIc} WT und InIB_{321/StrepIIc} LoF in einem 10%igen PA-Gel mit anschließender Anfärbung mit Coomassie Fast-Silver-Färbelösung konnte bei beiden Proteinen eine sehr eng beieinander laufende Doppelbande visualisiert werden. Nach Transfer der Doppelbanden auf eine PVDF-Membran wurden die Banden ausgeschnitten und N-terminal sequenziert. Die jeweils

höher laufende Bande wies einen vollständigen N-Terminus auf, bei den beiden Proteinen der jeweils unteren Banden fehlten die N-terminalen vier Aminosäuren. Das Triplett gtg der N-terminal gelegenen fünften Aminosäure Valin wird von *E.coli BL21* ebenfalls als Startcodon verwendet.

C. HGF/SF

Der humane Wachstumsfaktor HGF/SF wurde in der Maus-Myeloma-Zelllinie NSO exprimiert und nach Sekretion in den Kulturüberstand aufgereinigt. Die proteolytische Prozessierung von Pro-HGF/SF zu heterodimerem aktiven HGF/SF findet durch die extrazelluläre Protease uPA (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator) im Kulturüberstand statt.

Aminosäure-Sequenz von HGF/SF (Einbuchstaben-Code):

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLLPIAIPYAEGRKRRNTIHE
 FKSAKTTLIKIDPALKIKTKKVNTADQCANRCTR NKGLPF
 TCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDLYEN
 KDYIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSF
 LPSSYRGKDLQENYCRNPRGEEGGPWCF TSNPEVRYEVC
 DIPQCSEVECMTCNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQTP
 HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPW CYTLDPHTR
 WEYCAIKTCADNTMNDTDVPLETTECIQGQGE GYRGTVN
 TIWNGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNP
 DGSESPWCFTTDPNIRVG YCSQIPNCDMSHGQDCYRGNG
 KNYMGNLSQTRSGLTCSMW DKNMEDLHRHIFWEPDASKL
 NENYCRNPDDDAHGPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTT
 PTIVNLDHPVISCAKTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRN
 KHICGGSLIKESWVLTARQC FPSRDLKDYEAWLGIHDVHG
 RGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLMKLARPAVLDDFVS
 TIDLPNYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYI
 MGNEKCSQHHRGKVT LNESEICAGAEKIGSGPCEGDYGG
 PLVCEQHKMRMVLGVIVPGRGCAIPNRPGIFVRVAYYAKW
 IHKIILTYKVPQS

Molekulargewicht:	Pro-HGF/SF	83134Da
	Dimeres HGF/SF	79679Da
	α -Kette	53684Da
	β -Kette	25995Da

ROT: HGF/SF- α -Kette

BLAU: HGF/SF- β -Kette

Der in dieser Arbeit verwendete Wachstumsfaktor HGF/SF stammt aus der Expression mit dem NSO-Klon SQT10/A51.10. HGF/SF wurde freundlicherweise von Dr. Ermanno Gherardi, MRC Centre and Laboratory of Molecular Biology, Cambridge UK zur Verfügung gestellt, der die Expression und Aufreinigung durchführte.

5. Westernblot-Analysen von Kinasen im c-Met-Signalweg

Zur vergleichenden Analyse der c-Met-Expression und -Aktivierung in den Zelllinien HeLa S3 und DU-145 bzw. der zeitaufgelösten Westernblot-Analyse von Kinasen der c-Met-Signalkaskade nach Stimulation mit den c-Met-Liganden (Kapitel VII.4.) in der HeLa S3-Zelllinie wurden von jeder Zelllinie je Ansatz $4 \cdot 10^5$ Zellen in 3cm-Zellkulturschalen (#353001, Falcon™, BD Biosciences) in Standard-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 7.5% CO₂ inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen über einen Zeitraum von acht Stunden unter Serum-freien Bedingungen in Minimal-Medium konditioniert, wobei das Medium dreimal erneuert wurde.

Für die Analyse der Expression von c-Met in HeLa S3 und DU-145 wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in 50µl 4xSDS-Probenpuffer (Kapitel VII.2.A.) unter Zugabe von 1µl Benzonase (#1.01695.0001, Merck KGaA) je Schale lysiert. Um die c-Met-Aktivierung zu charakterisieren wurde jede Zelllinie mit 10nM InlB₃₂₁ für vier Minuten bei 37°C stimuliert. Die Kontroll-Ansätze wurden mit dem gleichen Volumen an PBS für vier Minuten behandelt. Nach Ablauf der Stimulations-Zeit wurden diese Ansätze ebenfalls in 50µl 4xSDS-Probenpuffer unter Zugabe von 1µl Benzonase je Schale lysiert. Von jedem Ansatz wurden nach Unterpunkt VII.2.A. 5µl der Gesamt-Lysate in einem 10%igen PA-Gel aufgetrennt. Die Bestimmung der c-Met-Expression bzw. -Aktivierung erfolgte nach Unterpunkt VII.2.E. mit den Primär-Antikörpern Met (C12) bzw. Phospho-Met (Tyr1234/1235) und Anti-Actin (20-33).

Die Westernblot-Analysen von Kinasen nach Aktivierung der c-Met-Signalkaskade erfolgte in HeLa S3-Zellen. Für jeden Ansatz wurden $4 \cdot 10^5$ Zellen in 3cm-

Zellkulturschalen in Standard-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 7.5% CO₂ inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen über einen Zeitraum von acht Stunden unter Serum-freien Bedingungen in Minimal-Medium konditioniert, wobei das Medium dreimal erneuert wurde. Nach Ablauf der achtstündigen Konditionierungs-Phase erfolgte die Stimulation mit 10nM InlB₃₂₁ oder 1nM HGF/SF. Je Ligand wurde zwei, vier, sechs und acht Minuten stimuliert. Ein jeweiliger Kontroll-Ansatz wurde mit PBS behandelt. Der Vergleich von InlB₃₂₁, InlB₃₂₁/StreptIIc WT und InlB₃₂₁/StreptIIc LoF erfolgte in analoger Weise mit jeweils 10nM Ligand, jedoch wurde nur für vier Minuten stimuliert. Die Zellyse, die Proteintrennung und der Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgten wie bereits für die Analyse der C-Met-Expression beschrieben. Für die immunologische Detektion wurden die Primär-Antikörper Phospho-Met (Tyr1234/1235), Phospho-Mek1/2 (Ser217/221), Phospho-p44/42 MAPK (Thr201/203) E10, Phospho-Akt (Ser473) (587F11) und Anti-Actin (20-33) eingesetzt.

6. Quantitative Phosphokinom-Analyse

A. Synthese des ATP-kompetitiven Kinase-Inhibitors 2-[4-(2-Amino-ethoxy)-phenylamino]-8-cyclopentyl-8*H*-pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-on (V16743)

Die Planung und Ausführung der zweistufigen Synthese des ATP-kompetitiven Kinase-Inhibitors V16743 wurde von Dr. Zoltan Greff (Vichem Chemie Research Ltd, Budapest ,Ungarn) und Prof. György Keri (Vichem Chemie Research Ltd, Budapest ,Ungarn und Department of Medicinal Chemistry, Peptide Biochemistry Research Group, Semmelweis University, Budapest, Ungarn) übernommen und wie folgt durchgeführt:

i) Präparation von 2-{2-[4-(8-Cyclopentyl-7-oxo-7,8-dihydro-pyrido [2,3-*d*]pyrimidin-2-ylamino)-phenoxy]-ethyl}-isoindol-1,3-dion

0,32g (1mmol) 8-Cyclopentyl-2-methansulfonyl-8*H*-pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-on (Barvian et al., 2000), 0,28g (1mmol) 2-[2-(4-amino-phenoxy)-ethyl]-isoindol-1,3-dion (Moloney et al., 1997) und 0,13g (0,17cm³, 1mmol) N-ethyldiisopropylamin wurden unter Rückfluss in Argon-gesättigter Atmosphäre in 20cm³ 2-Propanol für 24 Stunden gekocht. Das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck verdampft und das Produkt wurde in 30cm³ Wasser und 30cm³ Ethyl-Acetat ausgeschüttelt. Die abgenommene wässrige Phase wurde weitere zweimal mit 30cm³ Ethyl-Acetat ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen wurden mit 30cm³ gesättigter Salzlösung gewaschen und durch Zugabe von Magnesium-Sulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde unter

reduziertem Druck verdampft. Das Produkt wurde anschließend aus 10cm³ Acetonitril auskristallisiert.

ii) Präparation von 2-[4-(2-Amino-ethoxy)-phenylamino]-8-cyclopentyl-8*H*-pyrido [2,3-*d*] pyrimidin-7-on

0.52g (1mmol) 2-{2-[4-(8-Cyclopentyl-7-oxo-7,8-dihydro-pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-2-ylamino)-phenoxy]-ethyl}-isoindol-1,3-dion und 0.52g (0,48cm³, 10mmol) Hydrazin-Hydrat wurden in 25cm³ Ethanol unter Rückfluss für drei Stunden gekocht. Das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck verdampft und das Produkt wurde in 30cm³ 3N HCl in Wasser und 30cm³ Ethyl-Acetat ausgeschüttelt. Die abgenommene wässrige Phase wurde weitere viermal mit 30cm³ Ethyl-Acetat ausgeschüttelt. Der pH-Wert der vereinten wässrigen Phasen wurde durch Zugabe von Natrium-Karbonat auf zehn justiert, anschließend wurde die wässrige Phase weitere dreimal mit einer 2:1-Mischung von Ethyl-Acetat und Tetrahydrofuran extrahiert. Die gesammelten und vereinten organischen Phasen wurden mit 30cm³ gesättigter Salzlösung gewaschen und durch Zugabe von Magnesium-Sulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck verdampft. Das Produkt wurde anschließend aus 5cm³ Acetonitril auskristallisiert.

Der synthetisierte ATP-kompetitive Kinase-Inhibitor V16743 gehört zur Molekülklasse der Pyridopyrimidine und hat ein Molekulargewicht von 365.44. V16743 wurde freundlicherweise von Dr. Henrik Daub (Cell Signaling Group, Abt. für Molekularbiologie, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

B. Kopplung von V16743 an Affinitäts-chromatographisches Material

Die Kopplung des ATP-kompetitiven Kinase-Inhibitors V16743 an ECH-Sepharose erfolgte nach der Karbodiimid-Methode: die benötigte Menge an ECH-Sepharose 4B (#17-0571-01, Amersham Biosciences) wurde dreimal mit 0.5M NaCl in ddH₂O und zweimal in ddH₂O gewaschen. Nach Absetzen der Sepharose wurde das überstehende Wasser abgenommen und ein zur Sepharose korrespondierendes Volumen an ddH₂O zugegeben, so dass eine 50%ige wässrige Sepharose-Suspension resultierte. Die Sepharose-Suspension wurde zu je 1ml in 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Zum Packen einer Säule mit gekoppelter ECH-Sepharose wurde 1ml Affinitäts-Material benötigt. Da insgesamt vier Säulen eingesetzt wurden, wurden für die

Kopplung acht 2ml-Eppendorf-Gefäße mit je 1ml 50%iger wässriger Sepharose-Suspension eingesetzt. Nach Absetzen der Sepharose wurde der wässrige Überstand abgenommen und verworfen. Die Sepharose wurde zweimal mit einer 1:1-Mischung aus DMF/EtOH (pH6) gewaschen, um ein die Kopplungsreaktion begünstigendes wasserfreies System zu erhalten. Überschüssiges DMF/EtOH wurde erneut abgenommen. Zur Sepharose wurde je 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß 1ml V16743-Lösung gegeben. Die Kopplungs-Reaktion wurde durch tropfenweise Zugabe von 150µl EDC-HCl-Lösung gestartet. Während der EDC-HCl-Zugabe wurde zwischenzeitlich gevortext. Nach vollständiger Zugabe wurde das Gemisch aus ECH-Sepharose 4B, V16743 und EDC-HCl in DMF/EtOH unter Lichtabschluss über Nacht bei Raumtemperatur am Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach Absetzen der Überstand abgenommen und die Sepharose zweimal mit 1ml DMF/EtOH gewaschen. Um nicht abreagierte reaktive Carboxyl-Gruppen der ECH-Sepharose 4B zu blockieren, wurde je Eppendorf-Reaktionsgefäß 1ml Ethanolamin-Lösung zugegeben. Die Reaktion wurde erneut durch tropfenweise Zugabe und zwischenzeitlichem Vortexen von 150µl EDC-HCl-Lösung je Eppendorf-Gefäß gestartet. Die Reaktion fand unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur über Nacht am Drehrad statt. Am nächsten Tag wurde die Sepharose zweimal mit DMF/EtOH, einmal mit HEPES/NaCl und zweimal mit ddH₂O gewaschen. Bis zum Einsatz der V16743-gekoppelten Sepharose wurde diese in 20% EtOH in ddH₂O bei 4 °C unter Lichtabschluss gelagert.

DMF/EtOH (pH6, konz. HCl)

DMF 50% (v/v)

EtOH p.A. 50% (v/v)

V16743-Lösung

DMF/EtOH (pH6, konz. HCl)

V16743 3mM

EDC-HCl-Lösung

EDC-HCl 1M

DMF/EtOH (pH6, konz. HCl)

Ethanolamin-Lösung

Ethanolamin 1M in ddH₂O 34% (v/v)

DMF 33% (v/v)

EtOH p.A. 33% (v/v)

HEPES/NaCl (pH 7.5, NaOH)

HEPES 50mM

NaCl 0.5M

ddH₂O

Für die Affinitäts-Chromatographie wurden vier Tricorn™ 5/50-Säulen (GE Healthcare) eingesetzt. Die Säulen, Filter und sämtliche Anschluss-Stücke wurden in ddH₂O im Ultraschallbad gereinigt. Jede Säule wurde nach Hersteller-Angaben mit 1ml V16743-Sepharose befüllt und an einem P-500-Pumpensystem (Pharmacia LKB) mit entgastem und filtriertem 50mM HEPES (NaOH, pH7.5)-Puffer bei einer Flussrate von 3ml/h eingespült.

C. Zellkultur und Stimulation der c-Met-Signalkaskade

HeLa S3-Zellen wurden in Standard-Medium in 300cm²-Zellkulturflaschen (#90301, TPP, Schweiz) amplifiziert. Nach Ablösen der Zellen durch Zugabe von Trypsin (Kapitel VII.3.B.) wurden diese in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und mit einer Zellzahl von $3 \cdot 10^6$ Zellen je Schale homogen auf 50 15cm-Zellkultur-Schalen (#430599, Corning) in je 35ml Standard-Medium ausgebracht. Nachdem die Zellen über Nacht einen adhärennten semikonfluenten Zustand erreicht hatten, wurden diese durch Austausch des Standard-Mediums gegen Minimal-Medium über einen Zeitraum von 24 Stunden unter Serum-freien Bedingungen konditioniert. Das Minimal-Medium wurde während der 24stündigen Konditionierung dreimal erneuert, um eine Autoinduktion durch von den Zellen in das Medium abgegebene Wachstumsfaktoren zu minimieren. Der letzte Mediums-Wechsel erfolgte drei Stunden vor der Induktion mit exakt 25ml Minimal-Medium je 15cm-Schale. Die Zellen haben sich während der Konditionierungsphase nicht mehr verdoppelt, weshalb der für die Induktion der c-Met-Signalkaskade optimale semikonfluente Zustand erhalten blieb (Ishibe et al., 2006).

Die Stimulation der Zellen erfolgte je nach Experiment durch verschiedene in sterilem PBS gelöste c-Met-Liganden (VII.4.). In drei Experimenten wurden 25 der 50 Zellkultur-Schalen mit 10nM InlB₃₂₁ stimuliert (Induktions-Ansatz), wohingegen die restlichen 25 Schalen mit derselben Menge an PBS behandelt wurden (Kontroll-Ansatz). In einem Experiment erfolgte die Induktion von 25 Zellkultur-Schalen mit 1nM HGF/SF (Induktions-Ansatz), die übrigen 25 Schalen wurden wiederum mit demselben Volumen PBS behandelt (Kontroll-Ansatz). In einem weiteren Experiment wurden 25 Schalen mit 10nM InlB₃₂₁/StreptIIIC WT (Induktions-Ansatz) und 25 Schalen mit 10nM InlB₃₂₁/StreptIIIC LoF (Kontroll-Ansatz) induziert. In jedem Experiment wurde je

eine Schale des Induktions- und eine Schale des Kontroll-Ansatzes gleichzeitig behandelt. Nach Zugabe der Liganden bzw. von PBS wurden die Schalen für vier Minuten im Brutschrank inkubiert, anschließend das Medium abgeschüttet und Reste abgesaugt und je Schale 1.5ml eiskalter Hochsalz-Lysispuffer zugegeben. Nach schneller Verteilung des Lysispuffers durch Schwenken wurden die Zellen durch Eintauchen der Schalen-Unterseite in flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf Trockeneis gelagert, bis sämtliche Schalen eines Experiments bearbeitet waren.

Hochsalz-Lysispuffer

HEPES (pH7.5, NaOH)	50mM
NaCl	1M
EGTA	1mM
Complete Protease-Inhibitor	1 Tab./50ml
NaF (0.5M Stocklösung)	10mM
Na ₃ VO ₄ (0.2M Stocklösung)	2.5mM
Calyculin A	50ng/ml
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	1:100
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	1:100
Triton X-100	1% (v/v)

D. Herstellung von Gesamtzell-Extrakten

Die gefrorenen Zellkultur-Schalen wurden in einem 4°C-Raum für ca. 30min akklimatisiert bis der Lysispuffer einen flüssigen Zustand erreicht hatte. Anschließend wurden die Zellen im Hochsalz-Lysispuffer mit Zellschabern von der Kultur-Schale abgelöst und je Ansatz in einem vorgekühlten 50ml-Falcon-Röhrchen vereint. Das Gesamtvolumen des Kontroll- und des Induktions-Ansatzes wurde mit eiskaltem Lysispuffer auf 45ml eingestellt. Der Zellaufschluss erfolgte durch sechsmalige Ultraschallbehandlung auf Eis mit je 5sec Schall-Dauer (Bandelin Sonoplus HD200, Lanze MS73, maximale Leistung). Zwischen jeder Schall-Periode wurde 30sec auf Eis zwischengekühlt. Die aufgeschlossenen Zellsuspensionen wurden bei 4°C und 70.000 xg für 30min ultrazentrifugiert (Avanti J30I, Rotor JS24-15). Die Überstände beider Ansätze wurden abschließend durch vorgekühlte 0.45µm-Spritzenfilter (Sterivex™-HV, #SVHV010RS, Millipore) in vorgekühlte 50ml-Falcon-Röhrchen filtriert.

E. Kinase-selektive Affinitäts-Chromatographie

Die Affinitäts-Chromatographie wurde bei 4 °C durchgeführt. Je Ansatz (Kontrolle und Induktion) wurden zwei mit je 1ml V16743-gekoppelter ECH-Speharose 4B gepackte Tricorn 5/50-Säulen (Kapitel VII.6.B.) in Reihe geschaltet. Jede der beiden Säulen-Reihen wurde über ein V-7 Handventil (Pharmacia LKB) an eine P-500-Pumpe (Pharmacia LKB) angeschlossen. Beide Säulenreihen wurden bei einer Flussrate von 3ml/h in filtriertem und entgastem Puffer A über Nacht äquilibriert. Die Überstände des Kontroll- und des Induktionsansatzes wurden über eine P-50-Pumpe (Pharmacia LKB) in je eine 50ml-Probenschleife gefüllt, die an die V-7 Handventile angeschlossen waren. Der Probenauftrag fand bei einer Flussrate von 3ml/h statt, indem über die passende V-7 Handventilstellung die Probenschleifen in Fluss vor die jeweilige Säulenreihe geschaltet wurden. Nach Abschluss des Probenauftrages wurden die V16743-Säulen mit Puffer A bei einer Flussrate von 6ml/h über 24 Stunden gewaschen (ca. 70 Säulenvolumina je Säule). Die Säulen wurden anschließend bei einer Flussrate von 6ml/h in filtriertem und entgastem Puffer B für drei Stunden äquilibriert und aus dem System genommen. Die Elution fand bei Raumtemperatur an einer P-500-Pumpe (Pharmacia LKB) statt. Nachdem die Säulen akklimatisiert waren, wurden gebundene Proteine bei einer Flussrate von 6ml/h gegen die Auftragsrichtung unter denaturierenden Bedingungen mit 0.5% SDS in ddH₂O eluiert. Es wurden je Säule zwölf Fraktionen mit je 0.5ml Volumen in Oberflächen-optimierten Reaktionsgefäßen (Polymer-beschichtet, minimale Probenhaftung, #7154.1, Carl-Roth GmbH + Co. KG) gesammelt (Frac-100, Pharmacia LKB). Alle weiteren Proben-Bearbeitungs-Schritte eines gesamten Experiments wurden in den Oberflächen-optimierten Reaktionsgefäßen durchgeführt, um einen Probenverlust möglichst minimal zu halten. Unmittelbar nach der Elution wurden alle Fraktionen mit 50µl 200mM 1,4-Dithiothreitol (DTT) versetzt und für 30min bei 56°C geschüttelt. Anschließend wurden 55µl 500mM 2-Iodacetamid (IAA) zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss geschüttelt. Durch die denaturierende Elution und die anschließende Reduktion und Carbamidomethylierung von Cystingruppen und reaktiven Cystein-Seitenketten wurde gewährleistet, dass keinerlei biologische Aktivität in den Proben mehr vorhanden war. Von jeder Fraktion wurde ein 10%-Aliquot in einer 12%igen PA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die getrennten Proteine wurden nach dem Coomassie Fast-Silver-Protokoll angefärbt (Kapitel VII.2.B.). Die Eluat-Fraktionen wurden bis zur weiteren Bearbeitung unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur gelagert. Protein-haltige Fraktionen eines Ansatzes wurden vereint und unter reduziertem Druck in einem Vakuum-Konzentrator auf ein Zehntel des Ausgangsvolumen eingengt. Somit wurde gewährleistet, dass eine für die

anschließende Proteinfällung maximal mögliche SDS-Endkonzentration von 5% nicht überschritten wurde.

Puffer A

HEPES (pH7.5, NaOH)	50mM
NaCl	1M
EGTA	1mM
EDTA	1mM
NaF (0.5M Stocklösung)	10mM
Na ₃ VO ₄ (0.2M Stocklösung)	2.5mM
Triton X-100	0.1% (v/v)

Puffer B

HEPES (pH7.5, NaOH)	50mM
EGTA	1mM
EDTA	1mM
NaF (0.5M Stocklösung)	10mM
Na ₃ VO ₄ (0.2M Stocklösung)	0.1mM
Triton X-100	0.1% (v/v)

F. Proteinfällung, Verdau und Peptidreinigung

Die Proteine eines jeden Ansatzes wurden nach dem Protokoll von Wessel und Flügge (Wessel und Flügge, 1984) ausgefällt. Hierfür wurde zu jedem aufkonzentriertem Ansatz das vierfache Probenvolumen an kaltem Methanol zugegeben, kurz geschüttelt und für 30min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde ein einfaches Probenvolumen kaltes Chloroform zugegeben, erneut geschüttelt und für 30min bei 4 °C inkubiert. Abschließend wurde das dreifache Probenvolumen kaltes ddH₂O zugegeben, geschüttelt und bei 4 °C für 30min inkubiert. Die Phasenausbildung erfolgte unter Zentrifugation bei 4000 xg und 4 °C für zehn Minuten (Sigma Tischzentrifuge 2K15C). Der wässrige Überstand wurde vorsichtig bis zur Interphase abgenommen. Durch erneute Zugabe des dreifachen Proben-Ausgangsvolumens an kaltem Methanol und leichtem Schütteln wurde die Phasengrenze gebrochen und ausgefällte Proteine wurden bei 4000 xg für 60min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die durch die Fällung gereinigten Proteinpellets beider Ansätze wurden für ca. zehn Minuten unter Stickstoff-Fluss getrocknet.

Um einen vollständigen tryptischen Verdau zu gewährleisten, wurde folgendes Protokoll etabliert: die getrockneten Protein-Pellets aus der Wessel-Flügge-Extraktion wurden durch leichtes Scheren in jeweils 200µl Verdauopuffer resuspendiert und je Ansatz 2µg nach Hersteller-Angaben aktiviertes in Verdauopuffer resuspendiertes Trypsin (Sequencing Grade modified Trypsin, #V511A, Promega) zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C unter Schütteln. Nach drei Stunden wurden je Ansatz weitere 4µg Trypsin zugegeben und der Verdau über Nacht bei 37°C fortgeführt. Am nächsten Tag wurden erneut 2µg Trypsin je Ansatz zugegeben und weitere zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend in einem Vakuum-Konzentrator bis zur vollständigen Trocknung eingengt.

Die Peptidreinigung erfolgte über C₁₈-Umkehrphasen-Chromatographie (RP). Hierfür wurden die getrockneten Verdau-Ansätze in je 200µl RP-Puffer A resuspendiert. Der pH-Wert nach Resuspendierung der Verdau-Ansätze wurde anhand eines Universal-Indikator-Papierstreifens (pH1-11, Macherey-Nagel) überprüft und gegebenenfalls durch tropfenweise Zugabe von 2%iger TFA-Lösung in ddH₂O auf pH2-3 nachjustiert. Für die RP-Chromatographie wurde für jeden Ansatz eine Bakerbond speTM-Leersäule mit unterer Fritte (#7121-01, J.T. Baker) mit in RP-Puffer B resuspendiertem LiChroprep[®] RP-18 (25-40µm, #1.09303.0100, Merck KGaA)-Material bis zu einer Füllhöhe von 0.5cm befüllt und mit einer oberen Fritte versehen. Nach Befüllen der Fritte wurde das Material dreimal mit RP-Puffer B gewaschen und aktiviert und dreimal mit RP-Puffer A äquilibriert, indem die jeweilige Puffer-Lösung mit Stickstoff langsam durch die Säule gedrückt wurde. Dabei war zu beachten, dass das RP-Material nicht trocken fiel. Die in RP-Puffer A resuspendierten Verdau-Ansätze wurden langsam auf die jeweilige Säule aufgetragen und der Durchlauf (D) wurde aufgefangen. Insgesamt wurde ein Durchlauf fünfmal hintereinander langsam durch eine Säule gedrückt. Anschließend wurden die an RP-18 gebundenen Peptide dreimal mit je 0.75ml RP-Puffer A gewaschen. Die Elution gebundener Peptide erfolgte durch dreimalige Zugabe von je 0.3ml RP-Puffer B. Die Durchlauf- und Waschlösungen wurden vereint (DW) und unter reduziertem Druck bis zur Trockne eingedampft. Das Eluat (E) wurde ebenfalls vollständig eingengt.

Um zu überprüfen, ob Durchlauf- und Waschlösung Peptid-frei waren, wurden die vereinten und getrockneten Durchlauf- und Waschlösungen (DW) anschließend in 50µl RP-Puffer A resuspendiert. Durch einen weiteren Peptid-Reinigungsschritt mit ZipTip-C18µ-Pipettenspitzen (#ZTC18M960, Millipore) nach Hersteller-Angaben mit den beiden RP-Puffern A und B wurden eventuell noch in Durchlauf und Waschlösung vorhandene Peptide angereichert und in ein neues Eppendorfgefäß in 5µl RP-Puffer B eluiert. Aus dieser Eluat-Lösung wurden 1µl zusammen mit 1µl Matrixlösung auf ein Dünnschicht-Target pipettiert. Nach Trocknung des Peptid-

Spots wurde das Target in ein ULTRAFLEX-TOF/TOF (Bruker Daltonics) eingeschleust. Die MALDI-Messung erfolgte über die Software Flex Control (Bruker Daltonics). Von einem ProbenSpot wurden 200 Schüsse addiert. Falls typische Peptidionen-Signaturen im Spektrum detektiert wurden, wurde eine erneute Peptidreinigung über C₁₈-Umkehrphasen-Chromatographie (RP) durchgeführt, bis sämtliche Peptide eines Ansatzes gereinigt waren.

Verdaupuffer (pH8.3, 16%ige HCl)

TEAB	50mM
ACN	10% (v/v)

RP-Puffer A (pH2.5, 2%ige TFA)

TFA	0.2% (v/v)
-----	------------

RP-Puffer B (pH2.5, 2%ige TFA)

TFA	0.2% (v/v)
ACN	60% (v/v)

Matrixlösung

α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure	10g/L
ACN	10% (v/v)
TFA 0.1%	60%

G. iTRAQ™-Markierung

Zur relativen Quantifizierung wurden die gereinigten und getrockneten Peptid-Ansätze im folgenden Schritt mit iTRAQ™-Reagenzien (iTRAQ Reagents Multiplex Kit, #4352135, Applied Biosystems) modifiziert. Je zwei gleiche der vier möglichen iTRAQ™-Reagenzien mit Reportermassen von 114, 115, 116 oder 117Da wurden aufgetaut und mit jeweils 70µl im Kit enthaltenem EtOH vermischt. Die Peptidansätze (Kontrolle, Induktion) wurden in je 80µl iTRAQ™-Dissolutionbuffer resuspendiert. Zu jedem Ansatz wurden 140µl eines in EtOH resuspendierten iTRAQ™-Reagenzes zugegeben, gevortext und kurz anzentrifugiert. Die Inkubation erfolgte unter Lichtabschluss für 80min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden beide Ansätze vereint und in einem Vakuum-Konzentrator bis zur Trocknung eingeeengt. Über C₁₈-Umkehrphasen-Chromatographie (Kapitel VII.6.F.) wurden die markierten Peptide erneut aufgereinigt und überschüssiges iTRAQ™-Reagenz ausgewaschen. Die RP-18-Eluate wurden erneut unter reduziertem Druck getrocknet.

H. Separation phosphorylierter Peptide (IMAC)

Die Anreicherung phosphorylierter Peptide aus der komplexen iTRAQTM-markierten Peptid-Mischung beider Ansätze erfolgte über das Phosphopeptide Isolation Kit (#89853, Pierce) mit einem in dieser Arbeit optimierten Protokoll. Die gereinigten, getrockneten und vereinten Peptid-Ansätze aus der iTRAQTM-Markierung wurden in 100µl Bindungspuffer resuspendiert. Zu diesem Ansatz wurden drei Ga³⁺-Geldisks aus dem Phosphopeptide Isolation Kit zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur unter Schütteln für 60 Minuten. Anschließend wurde die Suspension in eine Ga³⁺-Leersäule aus dem Phosphopeptide Isolation Kit überführt. Durch Zentrifugation bei 400 xg und Raumtemperatur wurde der Durchlauf aufgefangen. Die an Ga³⁺ gebundenen Peptide wurden zehnmal mit je 100µl Waschpuffer und zehnmal mit je 100µl Bindungspuffer gewaschen. Die spezifische Elution erfolgte durch zehnmalige Zugabe von je 100µl Phosphat-haltigem Elutionspuffer mit anschließender 3minütiger Inkubation und Zentrifugation bei 400 xg. Durchlauf und Waschlösungen wurden vereint (DW) und an einem Vakuum-Konzentrator eingetrocknet. Die Einzel-Eluate wurden ebenfalls vereint (E) und getrocknet. Die Peptide beider getrockneten Ansätze (DW und E) wurden durch Umkehrphasen-Chromatographie gereinigt und die Eluate erneut eingetrocknet (Kapitel VII.6.F.).

Bindungspuffer (pH 2.8, konz. Essigsäure)

MeOH	27% (v/v)
ACN	27% (v/v)
Essigsäure 10%	20% (v/v)

Waschpuffer (pH 2.8, konz. Essigsäure)

Bindungspuffer

NaCl	0.1M
------	------

Elutionspuffer (pH 4.5, Ammoniak)

Ammoniumphosphat	0.1M
------------------	------

I. Kationenaustausch-Chromatographie (SCX)

Die gereinigte und getrocknete komplexe Peptidmischung aus der DW-Fraktion (Kapitel VII.6.H.) nach Abreicherung phosphorylierter Peptide wurde über eine Kationenaustausch-Chromatographie vorfraktioniert. Die Durchführung erfolgte an einem Ettan-microLC-System, welches mit einem Autosampler A-905, einem

Pumpensystem P-905 und einem Detektor UPC-900 bestückt war und durch die Software Unicorn 5.01 gesteuert wurde (GE Healthcare). Die Peptidprobe wurde in 40µl SCX-Puffer A resuspendiert und bei 109.000 xg in einem S100AT3-308-Rotor ultrazentrifugiert (Sorvall® Discovery™ MS120SE, Hitachi). Der Überstand wurde in einem linearen Gradienten von 0%-35% SCX-Puffer B in 30min bei einer Flussrate von 150µl/min auf einer Mono S PC1.6/5-Säule (10µm Partikelgröße, #17-0672-01, GE Healthcare) fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden durch den Micro Fraction Collector/MALDI Spotter (Software SunCollect V 1.03, SunCollect) in PCR-Röhrchen (Greiner Bioone) gesammelt. Die Fraktionsgröße betrug 150µl. Peptid-haltige Fraktionen wurden durch Detektion der Absorption bei einer Wellenlänge von 214nm identifiziert.

SCX-Puffer A

Ameisensäure	0.065% (v/v)
ACN	25% (v/v)

SCX-Puffer B

Ameisensäure	0.065% (v/v)
ACN	25% (v/v)
KCl	0.5M

J. Peptid-Trennung und -Fragmentierung (HPLC-nESI-MS/MS)

Peptid-haltige Fraktionen aus der Kationenaustausch-Chromatographie wurden durch Umkehrphasen-Chromatographie (Kapitel VII.6.F.) gereinigt und die Eluate eingetrocknet. Phosphopeptid-abgereicherte gereinigte SCX-Fraktionen und Phosphopeptide-haltige gereinigte Peptid-Fraktionen (IMAC-Eluat E, Kapitel VII.6.H.) wurden anschließend über HPLC-nESI-MS/MS getrennt und fragmentiert. Hierfür wurde jede der einzelnen Fraktionen in RP-Puffer A (Kapitel VII.6.F.) resuspendiert und bei 109.000 xg in einem S100AT3-308-Rotor ultrazentrifugiert (Sorvall® Discovery™ MS120SE, Hitachi). Die Peptidtrennung erfolgte an einem Acquity Ultra Performance LC-System (Waters Corp.). Das System war mit einer C18-Vorsäule (5µm Symmetry C18, 180µm x 20mm, Waters Corp.) und einer analytischen BEH-Säule (1.7µm BEH130, 75µm x 150mm, Waters Corp.) ausgestattet. Die Steuerung erfolgte über die AcquityUPLC-Software V1.22. Die Proben wurden mit einer Flussrate von 15µl/min auf die Vorsäule gespült und 3min unter konstantem Fluss mit 99% UPLC-Puffer A gewaschen. Anschließend erfolgte die Trennung über 90-minütige (Tab. VII.5) oder 120-minütige (Tab. VII.6) Gradienten auf der analytischen Säule.

Tab. VII.5: 90-minütiger UPLC-Gradient.

Schritt	Zeit [min]	Flussrate [nl/min]	A [%]	B [%]
1	0	300	99	1
2	1	300	99	1
3	90	300	50	50
4	92	300	15	85
5	96	300	15	85
6	98	300	99	1

Tab. VII.6: 120-minütiger UPLC-Gradient.

Schritt	Zeit [min]	Flussrate [nl/min]	A [%]	B [%]
1	0	300	99	1
2	1	300	99	1
3	120	300	50	50
4	122	300	15	85
5	126	300	15	85
6	128	300	99	1

UPLC-Puffer A

Ameisensäure

0.1% (v/v)

UPLC-Puffer B

Ameisensäure

0.1% (v/v)

ACN

99.9% (v/v)

Die analytische Säule der UPLC war über einen PicoTip Emitter (New Objective, Inc.) mit einem Qtof microTM-Instrument (Waters Corp.) gekoppelt. Daten-abhängiges Umschalten vom MS- in den MS/MS-Modus erforderte die Detektion von 2⁺- und 3⁺-geladenen Peptidionen. Die Instrument-spezifischen Einstellungen sind in Tab. VII.7 zusammengefasst.

Tab. VII.7: Qtof micro™-spezifische MS- und MS/MS-Einstellungen.

Parameter	Survey	MS/MS
Modus	ES	
Polarität	positiv	
Massenbereich [m/z]	400-1600	50-2000
Kapillar-Spannung [kV]	1.8 (variabel)	
Konus-Spannung [V]	29	
Reflectron-Spannung [kV]	1.78	
TOF Spannung [kV]	5.63	
Multichannelplate Spannung [kV]	2.7-2.9	
Desolvations-Temperatur [°C]	150	
Quellen-Temperatur [°C]	80	
Intensitätsgrenze [counts/second]	10	1.0
Scan-Zeit [sec]	-	12
Interscan [sec]	-	0.1
Kollisionsgas	Argon	

Die Fragmentierung 2⁺- und 3⁺-Precursor-Ionen erfolgte unter für iTRAQ™-markierte Peptide optimierten Kollisions-Energien (Tab. VII.8).

Tab. VII.8: iTRAQ™-optimierte Kollisions-Energien.

Massenbereich [m/z]	Kollisions-Energie [eV]	
	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$
400	26	25
500	29	28
600	32	29
700	33	30
800	37	32
850	38	32
900	38	37
1000	41	39
1200	43	40
1300	44	42

K. Peptid-/Protein-Identifizierung

Aufgezeichnete Rohspektren wurden in MassLynx 4.1 (Matrix Science Ltd.) geglättet (7 Kanäle, zwei Wiederholungen, Savitzky-Golay) und zentroidiert (minimale Peakweite bei halbmaximaler Peakhöhe: 4 Kanäle). Erstellte pkl-Dateien der

einzelnen MS/MS-Läufe wurden über den Mascot Daemon V. 2.1.6 (Matrix Science Ltd.) gegen die SwissProt Datenbank 51.0 abgeglichen. Die Parameter sind in Tab. VII.9 dargestellt.

Tab. VII.9: Parameter der SwissProt-Datenbank-Suche.

Taxonomie	Homo Sapiens
Protease	Trypsin, maximal eine Fehlschnittstelle
Fixierte Modifikation	Carbamidomethyl (C)
	iTRAQ (K)
	iTRAQ (N-Terminus)
Variable Modifikation	Oxidation (M)
	Phospho (ST)
	Phospho (Y)
Precursor Ladung	2+ und 3+
Precursor Toleranz	65ppm
Fragmentionen Toleranz	0.15Da
Instrument Typ	ESI-QUAD-TOF
Suchtyp	MS/MS-Ionen Suche
Massen-Werte	Monoisotopisch

Es wurden zur Protein-Identifizierung nur Rank-1-Peptide zugelassen. Als Scoring-Verfahren wurde das Standard-Scoring von Mascot eingesetzt. Die Scoregrenze zur Peptid-Identifizierung wurde für jeden Datensatz mit einer Wahrscheinlichkeit $p < 0.05$ für eine Zufalls-Identifizierung gesetzt.

L. Regulationsanalyse

Von jedem eingesetzten iTRAQ™-Markierungskit wurden für alle vier Reagenzien die Nebenprodukt-Verteilung bestimmt. Hierfür wurden wenige Mikroliter eines jeden Reagenzes in eine Gold/Palladium-beschichtete Glasnadel (Proxeon Biosystems) eingebracht und an einem Q-TOF2™-Instrument (Micromass, Waters Corp.) analysiert. Die Kapillarspannung betrug 1.3V, die TOF-Spannung 9.1V und die Multichannelplate-Spannung 2.3 kV. Die Fragmentierung erfolgte unter steigenden Kollisions-Energien von 10eV bis 45eV im Abstand von 5eV-Schritten. Aus den über jeden Energie-Bereich summierten, geglätteten und zentroidierten Rohspektren wurden in MassLynx 4.1 die Ionen-Intensitäten der Precursormassen 114.1, 115.1, 116.1 und 117.1Da für jedes Reagenz ausgelesen und die prozentualen Anteile der Nebenprodukt-Ionen in jedem iTRAQ™-Reagenz ermittelt.

Die Regulationsanalyse erfolgte durch die Software iTRAQassist (Doktorarbeit Claudia Hundertmark, Zelluläre Proteomforschung, HZI). Hierfür wurden im Mascot Daemon alle pkl-Dateien eines Experimentes zusammengefügt und ein

gemeinsames DAT-File erstellt. Das DAT-File wurde in iTRAQassist geladen. Die zur Markierung der Peptidproben benutzten Reporter sowie die Regulations-Basis (der jeweilige Kontroll-Ansatz aus einem Experiment) wurden angegeben, der minimale Peptidscore betrug 20. Das Massen-Delta für die Reporter betrug 0.05Da. Zusätzlich wurden die Nebenprodukt-Verteilungen der iTRAQ™-Reporter eingeladen. Die Datenausgabe der iTRAQassist-Regulationsanalyse erfolgte in einer Excel-Tabelle und als graphische Darstellung. Regulierte Proteine und regulierte phosphorylierte Peptide wurden ab einem Faktor von 1.8 als hoch- und von einem Faktor von 0.6 als negativ reguliert betrachtet, wenn die von iTRAQassist kalkulierten Fehler-Wahrscheinlichkeiten unter dem für einen Datensatz spezifischen Grenzwert lagen.

M. Identifizierung unbekannter Phosphorylierungen

Durch die Mascot-Datenbanksuche ermittelte und durch manuelle Durchsicht der korrespondierenden Rohspektren validierte Phosphorylierungs-Stellen in Peptiden wurden in den Datenbanken UniprotKB/Swiss-Prot 51.0, Phosphosite (Stand 23.02.2007), Phospho.ELM 6.0 (Diella et al., 2004) und PhoSida (Olsen et al., 2006) gesucht. Falls in keiner dieser Datenbanken ein Eintrag vorhanden war, wurde die Phosphorylierungs-Stelle als unbekannt angenommen.

7. Untersuchungen an Nek9

A. Charakterisierung von Nek9-Interaktionen (SDS-PAGE-LC-MS/MS)

Für jeden Ansatz (Kontrolle oder Induktion) wurden auf zwei 15cm-Zellkultur-Schalen $8 \cdot 10^6$ HeLa S3 Zellen ausgebracht und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 7.5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen über einen Zeitraum von acht Stunden unter Serum-freien Bedingungen in Minimal-Medium konditioniert, wobei das Medium dreimal erneuert wurde. Nach vierminütiger Behandlung mit 10nM InlB₃₂₁ oder demselben Volumen an PBS wurde das Medium abgenommen, die Zellen in 750µl eiskaltem Niedrigsalz-Lysispuffer durch Einsatz eines Zellschabers von der Platte abgelöst und je Ansatz in ein vorgekühltes 1.5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis mit mehrmaligem Vortexen wurden nicht-resuspendierte Partikel bei 16.000 xg und 4°C für 10min pelletiert. Die Proteinkonzentration in den cytosolischen Extrakten der einzelnen Ansätze wurde nach Kapitel VII.2.C. ermittelt und gleiche Proteinmengen eines jeden Ansatzes mit kaltem Lysispuffer auf gleiche Volumina eingestellt. Für jeden Ansatz (typischerweise 3 bis 4mg Gesamtprotein) wurden zweimal 75µl gut

resuspendierte Dynabeads[®] ProteinG (#100.04D, Invitrogen Corp.) dreimal in 50mM HEPES pH7.5 gewaschen. Die Vorreinigung erfolgte durch Zugabe von 75µl gewaschener Beads zu jedem Ansatz mit anschließender 60minütiger Inkubation bei 4°C am Überkopf-Schüttler. Während dieser Inkubationszeit wurden je Ansatz 10µl des polyklonalen α-Nek9-Antikörpers (Serum, #H00091754-A01, Abnova Corp.) an 75µl gewaschene Dynabeads[®] unter Schütteln über 60 Minuten bei Raumtemperatur gekoppelt. An einem Magnet-Eppendorfgefäß-Ständer (#120.20D, MPC[™]-S, Invitrogen Corp.) wurden die mit Antikörper beladenen Beads zweimal mit 50mM HEPES pH7.5 gewaschen. Der Überstand aus der Vorreinigung wurde zu den beladenen Beads zugegeben. Die Immunopräzipitation (IP) erfolgte bei 4°C am Überkopfschüttler über Nacht. Die Beads aus der Vorreinigung und aus der IP wurden fünfmal mit Niedrigsalz-Lysispuffer gewaschen und anschließend in 4xSDS-Probenpuffer für 10min bei 80°C erhitzt. Ein Aliquot der Extrakte wurde ebenfalls mit SDS-Probenpuffer erhitzt (typischerweise 7-15µg je Ansatz). Die in Probenpuffer gelösten Eluate aus der Vorreinigung, der α-Nek9-pAB-IP und Proben der cytosolischen Extrakte wurden nach Kapitel VII.2.A. in einem 10% PA-Gel getrennt und nach Kapitel VII.2.B. gefärbt.

Zur Identifizierung der in der α-Nek9-pAB-IP angereicherten Proteine wurden die zu analysierenden Gelbereiche mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ca. 1mm² große Stücke zerkleinert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch mehrmaliges Waschen der Gelstückchen in Fixierlösung (Kapitel VII.2.B.) wurden die Proteinbanden entfärbt. Anschließend wurden die Gelstückchen in ddH₂O gewaschen und durch Übersichtung mit ACN für ca. 10-15 Minuten dehydriert. Nachdem die Gelstückchen eine weiße Färbung angenommen hatten, wurde der Überstand verworfen und durch 20mM DTT in 0.1M NH₄HCO₃ ersetzt (Reduktion von Cystin-Seitenketten). Nach 30minütiger Inkubation bei 56°C wurde der Überstand verworfen, die Gelstückchen dehydriert und in 55mM 2-Iodacetamid in 0.1M NH₄HCO₃ rehydriert (Carbamidomethylierung von reduzierten Cystein-Seitenketten). Nach einer 30minütigen Inkubation unter Lichtabschluss wurde der Überstand verworfen und die Gelstückchen erneut dehydriert. Anschließend wurden die Stückchen mehrmals in 0.1M NH₄HCO₃ gewaschen, dehydriert und unter reduziertem Druck getrocknet. Der In-Gel-Verdau erfolgte durch Rehydrierung und Übersichtung der Gelstückchen in nach Hersteller-Angaben aktiviertem und in 0.1M NH₄HCO₃ auf eine Konzentration von 2µg/ml verdünntem Trypsin (Kapitel VII.6.F.). Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Peptidextraktion erfolgte durch ca. 60minütiges Schütteln der Gelstückchen in (i) ddH₂O, (ii) 1%iger TFA in ddH₂O und (iii) 1%iger TFA in 50%ACN in ddH₂O. Der jeweilige Überstand wurde abgenommen und mit dem ersten Überstand vereint. Anschließend wurde die Extraktionslösung

unter reduziertem Druck vollständig getrocknet. Nach Reinigung der Peptide über ZipTip-C18 μ -Pipettenspitzen nach Unterpunkt VII.6.F. wurden diese über einen 45minütigen Gradienten an dem Acquity Ultra Performance LC-System getrennt (Tab. VII.10) und nach VII.6.J. an einem Qtof micro™-Instrument fragmentiert. Die Auswertung erfolgte nach Prozessierung (Glättung, Zentroidierung) der Rohdaten mittels MassLynx 4.1 durch einen Mascot-Datenbank-Abgleich mit Swiss-Prot. Bis auf iTRAQ (K) und iTRAQ (N-Terminus) wurden dieselben Freiheitsgrade wie unter Kapitel VII.6.K. zugelassen.

Tab. VII.10: 45-minütiger UPLC-Gradient.

Schritt	Zeit [min]	Flussrate [nl/min]	A [%]	B [%]
1	0	300	99	1
2	1	300	99	1
3	45	300	50	50
4	47	300	15	85
5	51	300	15	85
6	53	300	99	1

Niedrigsalz-Lysispuffer

HEPES (pH7.5, NaOH)	50mM
NaCl	150mM
MgCl ₂	10mM
EGTA	1mM
DTT	1mM
Complete Protease-Inhibitor (EDTA-frei)	1 Tab./50ml
NaF (0.5M Stocklösung)	10mM
Na ₃ VO ₄ (0.2M Stocklösung)	2.5mM
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	1:100
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	1:100
Glycerin (87%)	10% (v/v)
Igepal CA-630	1% (v/v)

B. Westernblot-Analysen nach Immunopräzipitation mit dem α -Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrat Antikörper

Für die α -Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrat Antikörper-IP (α -pAktS-IP) wurden fünf 10cm-Zellkultur-Schalen mit je $2 \cdot 10^6$ HeLa S3-Zellen (eine Schale je Ansatz) in Standard-Medium angeimpft und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 7.5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen über einen Zeitraum von acht Stunden

unter Serum-freien Bedingungen in Minimal-Medium konditioniert, wobei das Medium dreimal erneuert wurde. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 10nM InIB₃₂₁ für vier, acht, zwölf und 16 Minuten bzw. mit demselben Volumen an PBS als Kontrollansatz. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen in 250µl eiskaltem Nidrigsalz-Lysispuffer (Kapitel VII.7.A.) durch Einsatz eines Zellschabers von der Platte abgelöst und je Ansatz in ein vorgekühltes 1.5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis mit mehrmaligem Vortexen wurden nicht-resuspendierte Partikel bei 16.000 xg und 4°C für 10min pelletiert. Die Proteinkonzentration in den cytosolischen Extrakten der einzelnen Ansätze wurde nach VII.2.C. ermittelt und gleiche Proteinmengen eines jeden Ansatzes mit kaltem Lysispuffer auf gleiche Volumina eingestellt. Je Ansatz wurden 40µl Dynbeads[®]-M280 (Ziege-α-Hase-IgG, #112.03D, Invitrogen Corp.) dreimal in 50mM HEPES pH7.5 gewaschen, unter Schütteln für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 8µl α-Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrat Antikörper (#9611, Cell Signaling Technology) beladen und erneut gewaschen. Von jedem Ansatz wurden 450µg cytosolischen Proteinextrakts mit je 40µl beladenen Dynabeads[®] über Nacht bei 4°C am Überkopfschüttler inkubiert. Die Beads aus der IP wurden fünfmal mit Nidrigsalz-Lysispuffer gewaschen und anschließend in 4xSDS-Probenpuffer für 10min bei 80°C erhitzt. Ein Aliquot der Extrakte wurde ebenfalls mit SDS-Probenpuffer erhitzt (7µg je Ansatz). Die in Probenpuffer gelösten Eluate aus der α-pAktS-IP und die cytosolischen Extrakte wurden nach Kapitel VII.2.A. in einem 10% PA-Gel getrennt und nach VII.2.D. auf eine PVDF-Membran transferiert. Die immunologische Detektion von Nek9 und Aktin erfolgte nach Unterpunkt VII.2.E.

C. Westernblot-Analysen nach Immunopräzipitation mit dem α-Nek9-Antikörper

Für die α-Nek9-IP wurden zehn 10cm-Zellkultur-Schalen mit je 2*10⁶ HeLa S3-Zellen (zwei Schalen je Ansatz) in Standard-Medium angeimpft und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 7.5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen über einen Zeitraum von acht Stunden unter Serum-freien Bedingungen in Minimal-Medium konditioniert, wobei das Medium dreimal erneuert wurde. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 10nM InIB₃₂₁ für vier, acht, zwölf und sechzehn Minuten bzw. mit demselben Volumen an PBS als Kontrollansatz. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen in 250µl eiskaltem Nidrigsalz-Lysispuffer (Kapitel VII.7.A.) durch Einsatz eines Zellschabers von der Platte abgelöst und je Ansatz in ein vorgekühltes 1.5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis mit mehrmaligem Vortexen wurden nicht-resuspendierte Partikel bei 16.000 xg und 4°C für 10min pelletiert. Die Proteinkonzentration in den cytosolischen Extrakten der einzelnen Ansätze wurde nach Kapitel VII.2.C. ermittelt

und gleiche Proteinmengen eines jeden Ansatzes mit kaltem Lysispuffer auf gleiche Volumina eingestellt. Je Ansatz wurden 40µl Dynabeads® Protein G dreimal in 50mM HEPES pH7.5 gewaschen, unter Schütteln für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 6µl α-Nek9-Antikörper (H00091754-A01, Abnova Corp.) beladen und erneut gewaschen. Von jedem Ansatz wurde 1mg cytosolischen Proteinextrakts mit je 40µl beladenen Dynabeads® über Nacht bei 4°C am Überkopfschüttler inkubiert. Die Beads aus der IP wurden fünfmal mit Nidrigsalz-Lysispuffer gewaschen und anschließend in 4xSDS-Probenpuffer für 10min bei 80°C erhitzt. Ein Aliquot der Extrakte wurde ebenfalls mit SDS-Probenpuffer erhitzt (7µg je Ansatz). Die in Probenpuffer gelösten Eluate aus der α-Nek9-IP und die cytosolischen Extrakte wurden nach Kapitel VII.2.A. in einem 10% PA-Gel getrennt und nach Unterpunkt VII.2.D auf eine PVDF-Membran transferiert. Die immunologische Detektion von Nek9, Aktin und an den Tyrosinen Y¹²³⁴ und Y¹²³⁵ phosphoryliertem c-Met-Rezeptor erfolgte nach Unterpunkt VII.2.E.

D. Untersuchung zur MAP-Kinase- und PI3-Kinase-abhängigen Threonin T³³³-Phosphorylierung von Nek9

i) Dosis-abhängige inhibitorische Wirkung von LY294002 und U0126

Es wurden 16 3cm-Zellkulturschalen (#353001, Falcon™, BD Biosciences) mit je 4*10⁵ HeLa S3-Zellen (acht Schalen je Inhibitor) in Standard-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 7.5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen über einen Zeitraum von acht Stunden unter Serum-freien Bedingungen in Minimal-Medium konditioniert, wobei das Medium dreimal erneuert wurde. Für den letzten Mediums-Wechsel wurde das Minimal-Medium entweder mit DMSO oder mit den in DMSO gelösten Kinase-Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen wie folgt präpariert:

U0126 (#9903, Cell Signaling Technology):

Je zwei Zellkulturschalen (Doppelansätze) wurden mit 10µM, 50µM oder 100µM in DMSO gelöstem U0126 und zwei Schalen mit DMSO vorbehandelt

LY294002 (#9901, Cell Signaling Technology):

Je zwei Zellkulturschalen (Doppelansätze) wurden mit 10µM, 100µM oder 200µM in DMSO gelöstem LY294002 und zwei Schalen mit DMSO vorbehandelt

Nach zweistündiger Inkubation in Minimal-Medium mit dem jeweiligen Inhibitor oder DMSO wurde je eine Schale der Doppelansätze mit 10nM InI_B₃₂₁ und die andere

Schale mit demselben Volumen an PBS für vier Minuten induziert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in 50µl 4xSDS-Probenpuffer (Kapitel VII.2.A.) unter Zugabe von 1µl Benzonase (#1.01695.0001, Merck KGaA) je Schale lysiert. Nach Kapitel VII.2.A. wurden von jedem Ansatz 5µl der Gesamt-Lysate in einem 10%igen PA-Gel aufgetrennt und nach Unterpunkt VII.2.D. auf eine PVDF-Membran transferiert. Die immunologische Detektion erfolgte nach VII.2.E. mit den Primär-Antikörpern Phospho-Met (Tyr1234/1235), Phospho-Akt (Ser473) (587F11), Phospho-p44/42 MAPK (Thr201/Tyr203) E10 und Anti-Actin (20-33).

- ii) Analyse der inhibitorischen Wirkung von U0126 und LY294002 auf die Threonin T³³³ Phosphorylierung von Nek9

Die Experimente zur Charakterisierung des Einflusses der Inhibierung der Mek1/2-Kinasen durch U0126 und der PI3-Kinase durch LY294002 auf die Phosphorylierung von Threonin T³³³ wurden nach folgendem Ablauf analog für beide Inhibitoren durchgeführt:

Tab. VII.11: Behandlungs-Schema der verschiedenen Ansätze zur Analyse der inhibitorischen Wirkung von U0126 und LY294002 auf die T³³³-Modifikation von Nek9.

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
Vorbehandlung	DMSO	DMSO	Inhibitor	Inhibitor
Induktion	PBS	InIB ₃₂₁ 10nM	PBS	InIB ₃₂₁ 10nM

Zwölf 15cm-Zellkultur-Schalen wurden mit je 3*10⁶ HeLa S3-Zellen (drei Schalen je Ansatz) in Standard-Medium ausgebracht. Nachdem die Zellen über Nacht einen adhärennten semikonfluenten Zustand erreicht hatten, wurden diese durch Austausch des Standard-Mediums gegen Minimal-Medium über einen Zeitraum von 24 Stunden unter Serum-freien Bedingungen konditioniert. Das Minimal-Medium wurde während der 24stündigen Konditionierung dreimal erneuert. Der letzte Mediums-Wechsel erfolgte zwei Stunden vor der Induktion mit exakt 25ml Minimal-Medium je 15cm-Schale. Das Medium für den letzten Wechsel wurde entweder mit Inhibitor oder mit DMSO versetzt (U0126: 20µM; LY294002: 100µM; DMSO: ein dem Inhibitor-Volumen entsprechendes Volumen). Nach Ablauf der letzten zweistündigen Konditionierungs-Phase mit präpariertem Minimal-Medium wurden die einzelnen Ansätze entweder mit 10nM InIB₃₂₁ oder mit demselben Volumen an PBS für vier Minuten behandelt (Tab. VII.11). Anschließend wurde das Medium abgeschüttet und abgesaugt und je Schale 1.5ml eiskalter Hochsalz-Lysispuffer (Kapitel VII.6.C.) zugegeben. Nach schneller Verteilung des Lysispuffers durch Schwenken wurden die Zellen durch Eintauchen der Schalen-Unterseite in flüssigem Stickstoff

schockgefroren und auf Trockeneis gelagert, bis sämtliche Schalen eines Experimentes bearbeitet waren. Die gefrorenen Zellkultur-Schalen wurden in einem 4°C-Raum für ca. 30min akklimatisiert bis der Lysispuffer einen flüssigen Zustand erreicht hatte. Anschließend wurden die Zellen im Hochsalz-Lysispuffer mit Zellschabern von der Kultur-Schale abgelöst und je Ansatz in einem vorgekühlten 15ml-Falcon-Röhrchen vereint. Der Zellaufschluss erfolgte durch sechsmalige Ultraschallbehandlung auf Eis mit je 5sec Schall-Dauer (Bandelin Sonoplus HD200, Lanze MS73, maximale Leistung). Zwischen jeder Schall-Periode wurde 30sec auf Eis zwischengekühlt. Die aufgeschlossenen Zellsuspensionen wurden bei 4°C und 70.000 xg für 30min ultrazentrifugiert (Avanti J30I, Rotor JS24-15). Die Überstände der vier Ansätze wurden abschließend durch bei 4°C vorgekühlte 0.45µm-Spritzenfilter (Sterivex™-HV, #SVHV010RS, Millipore) in 4°C kalte 15ml-Falcon-Röhrchen filtriert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (Kapitel VII.2.C.) wurde je Ansatz dieselbe Konzentration durch Zugabe von kaltem Hochsalz-Lysispuffer eingestellt. Je Ansatz wurden 120µl Dynbeads® ProteinG dreimal in 50mM HEPES pH7.5 gewaschen, unter Schütteln für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 17µl α-Nek9-Antikörper (H00091754-A01, Abnova Corp.) beladen und erneut gewaschen. Die Immunopräzipitation erfolgte nach Probennahme aus dem Gesamt-Zellextrakt für eine Westernblot-Analyse (8µg je Ansatz) bei 4°C über Nacht am Überkopfschüttler, wobei je Ansatz 6mg Gesamt-Protein eingesetzt wurde.

Am nächsten Tag wurden die Dynbeads® ProteinG-α-Nek9-Präzipitate mittels des Magnet-Eppendorfgefäß-Ständer einmal mit Hochsalz-Lysispuffer und viermal mit Waschpuffer gewaschen und mit 120µl Verdaupuffer (Kapitel VII.6.F.) in Oberflächen-optimierte Reaktionsgefäße (Kapitel VII.6.E.) überführt. Die angereicherten Proteine wurden in der Bead-Suspension bei 37°C durch Inkubation mit 2µg Trypsin (Kapitel VII.6.F.) und einer weiteren Zugabe von 2µg Trypsin nach drei Stunden über Nacht verdaut. Am nächsten Tag wurde je Ansatz der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur vollständigen Peptid-Elution die Beads einmal mit Verdaupuffer und dreimal mit 0.2% TFA in ddH₂O nachbehandelt. Alle Überstände eines Ansatzes wurden vereint und unter reduziertem Druck getrocknet. Die Peptidreinigung erfolgte über C₁₈-Umkehrphasen-Chromatographie (RP) mit angefertigten LiChroprep® RP-18-Säulen (Kapitel VII.6.F.). Die Markierung der Peptide eines Ansatzes mit einem iTRAQ™-Reagenz erfolgte nach Kapitel VII.6.G., wobei nur ein iTRAQ™-Reagenz je Ansatz eingesetzt wurde, welches mit 70µl im Kit enthaltenen EtOH vermischt wurde. Die Peptide eines Ansatzes wurden in 40µl iTRAQ™-Dissolutionbuffer resuspendiert. Nach Abschluss der Reaktion wurden die vier Ansätze vereint und unter reduziertem Druck getrocknet. Ein erneute Peptidreinigung erfolgte nach Kapitel VII.6.F. Die Isolierung phosphorylierter Peptide

wurde nach Unterpunkt VII.6.H. durchgeführt. Durchlauf und Waschlösungen wurden vereint und an einem Vakuum-Konzentrator eingetrocknet (DW). Die einzelnen Eluate wurden ebenfalls vereint (E) und getrocknet. Die Peptide beider getrockneten Ansätze wurden durch Umkehrphasen-Chromatographie gereinigt und erneut eingetrocknet (Kapitel VII.6.F.). Die Analyse der vereinten und gereinigten DW-Fraktion und der vereinten und gereinigten E-Fraktion erfolgte analog zu VII.6.I (SCX) und VII.6.J. (HPLC-nESI-MS/MS), wobei für die SCX-Trennung ein linearer Gradient von 20 Minuten 0%-35% SCX-Puffer B und für die UPLC-Trennung ein 90-minütiger UPLC-Gradient gewählt wurde. Die Protein-Identifizierung und die Regulationsanalyse erfolgten nach den Kapiteln VII.6.K. und VII.6.L.

Waschpuffer:

HEPES (pH7.5, NaOH)	50mM
EGTA	1mM
EDTA	1mM
NaF (0.5M Stocklösung)	10mM
Na ₃ VO ₄ (0.2M Stocklösung)	0.1mM

VIII Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
2DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
AA	Amino acids
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
CCD	Charge-coupled device
CID	Collision induced dissociation
CML	Chronische Myeloide Leukämie
Da	Dalton
dd	doppelt destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
ESI	Electrospray ionisation
eV	Elektronenvolt
FDA	Arzneimittelzulassungsbehörde der USA (Food and Drug Administration)
g	Gramm
Ga	Gallium
GA	Gatekeeper-Aminosäure
GAGs	Glykosaminoglykane
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GK	Gatekeeper-Aminosäure in der ATP-Bindungstasche von Kinasen
GST	Glutathion-S-Transferase
GW-	Mit Glycin und Tryptophan beginnende C-terminale
Module	Sequenzbereiche in InIB
h	Stunde (hour)
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor (Hepatocyte growth factor)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (High performance liquid chromatography)
HRP	Horseradish peroxidase
ICAT	Isotope-coded affinity tag
Ig	Immunglobulin
IMAC	Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (Immobilized metal affinity chromatography)
InIA	Internalin (Internalin A)

InIB	Internalin B
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalaktopyranosid
IR	Inter-Repeat
iTRAQ	Isobaric tag for relative and absolute quantitation
KLS	Kernlokalisations-Sequenz
l	Liter
LC	Flüssigkeits-Chromatographie (Liquid chromatography)
LoF	InIB-Variante, die c-Met nicht binden kann (Loss of function)
LRR	Leucin-reiche Domänen (Leucin rich repeats)
M	Molar
m	Meter
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionisation
MAPKs	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
min.	Minute
MOAC	Metalloxid-Affinitäts-Chromatographie (Metal oxide affinity chromatography)
MS	Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
PA	Polyacrylamid
pAB	Polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PP	Pyridopyrimidin
pS	phosphoryliertes Serin
PSD	Post source decay
PSI	in den USA gebräuchliche Maßeinheit für Druck (Pounds per square inch)
pT	phosphoryliertes Threonin
PTM	Posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pY	phosphoryliertes Tyrosin
Q-TOF	Quadrupol-Flugzeit-Massenanalysator
RFmax	maximal wahrscheinlicher Regulationsfaktor (iTRAQassist)
RP	Umkehrphasen-Chromatographie (Reversed phase chromatography)
SCX	Kationenaustausch-Chromatographie (Strong cation exchange)
sec.	Sekunde
SF	Scatter factor

SILAC	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture
SP	Signal-Peptid
<i>spp.</i>	<i>Species pluralis</i>
Tab.	Tablette
Tab.	Tabelle
TOF	Flugzeit-Massenanalysator (Time-of-flight)
TPR	Translocated promotor region
UPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (Ultra performance liquid chromatography)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
w/v	Masse pro Volumen (weight per volume)
WT	Wildtyp (Wild type)
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung

2. Tabellen und Abbildungen

A. Tabellen

Ergebnisse

III.1:	IC ₅₀ -Werte von PP2, PP38, PP58 und PP63 für die Inhibierung der Tyrosinkinasen PGDFR, FGFR, c-SRC und EGFR.	32
III.2:	Reproduzierbarkeit der Proteinidentifizierung.	39
III.3:	Identifizierte Kinasen, die als Phosphat-Akzeptor niedermolekulare Substanzen verwenden.	39
III.4:	Prozentuale Anteile der V16743-spezifischen Kinasen am humanen Kinom.	42
III.5:	Prozentualer Anteil der vier häufigsten Gatekeeper-Aminosäuren an den V16743-gereinigten Kinasen.	43
III.6:	Anzahl der identifizierten Phosphorylierungs-Stellen nach InIB ₃₂₁ -Stimulation.	60
III.7:	Phosphorylierte Peptide von Kinasen, die nach InIB ₃₂₁ -Stimulation als reguliert detektiert wurden.	66
III.8:	Phosphorylierte Peptide von Proteinen ohne Kinase-Aktivität, die nach InIB ₃₂₁ -Stimulation als reguliert detektiert wurden.	66
III.9:	Datenbank-Einträge der nach InIB ₃₂₁ -Stimulation regulierten phosphorylierten Peptide von Kinasen und Proteinen ohne Kinase-Aktivität.	67
III.10:	Phosphorylierte Peptide von Kinasen, die nach InIB ₃₂₁ /StreptIIIC WT-Stimulation als reguliert detektiert wurden.	70
III.11:	Phosphorylierte Peptide von CABL1, die nach InIB ₃₂₁ /StreptIIIC WT-Stimulation als reguliert detektiert wurden.	70
III.12:	Datenbank-Einträge der nach InIB ₃₂₁ /StreptIIIC WT-Stimulation regulierten phosphorylierten Peptide von Kinasen und Proteinen ohne Kinase-Aktivität.	72
III.13:	Phosphorylierte Peptide von Kinasen, die nach HGF/SF-Stimulation als reguliert detektiert wurden.	76
III.14:	Differentielle Proteinregulationen an Kinasen nach Aktivierung des c-Met-Signalweges.	82
III.15:	Potentielle Nek9-assoziierte Proteine.	86
III.16:	iTRAQ TM -Reporter-Intensitäten des Nek9-Peptides SS ^{pT³³³} VTEAPIAVVTSR aus allen fünf quantitativen Phosphokinom-Studien.	91

Material und Methoden

VII.1:	Allgemeine Chemikalien und Reagenzien.	134
VII.2A:	Primär-Antikörper.	138
VII.2B:	Primär-Antikörper.	139
VII.3:	Sekundär-Antikörper.	139
VII.4:	In dieser Arbeit verwendete Zell-Linien.	140
VII.5:	90-minütiger UPLC-Gradient.	158
VII.6:	120-minütiger UPLC-Gradient.	158
VII.7:	Qtof micro TM -spezifische MS- und MS/MS-Einstellungen.	159
VII.8:	iTRAQ TM -optimierte Kollisions-Energien.	159
VII.9:	Parameter der SwissProt-Datenbank-Suche.	160
VII.10:	45-minütiger UPLC-Gradient.	163
VII.11:	Behandlungs-Schema der verschiedenen Ansätze zur Analyse der inhibitorischen Wirkung von U0126 und LY294002 auf die T ³³³ -Modifikation von Nek9.	166

B. Abbildungen

Einleitung

I.1:	<i>Listeria monocytogenes</i> angeheftet an Microvilli von Caco 2-Zellen.	1
I.2:	Schematische Darstellung des Infektionszyklus von <i>L. monocytogenes</i> .	3
I.3:	Schematische Darstellung der Proteine der Internalin-Familie.	4
I.4:	Die chromosomale Organisation der Virulenzgene <i>inlAB</i> und <i>inlC</i> .	4
I.5:	InlB-aktivierte Komponenten der c-Met-Signalkaskade.	7
I.6:	Domänen-Struktur der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met.	9
I.7:	Schematischer Aufbau der c-Met-Liganden HGF/SF und InlB.	11
I.8:	Interaktionsflächen von HGF/SF bzw. InlB zu c-Met.	12
I.9:	Fünf aromatische Aminosäuren in InlB ₃₂₁ sind essentiell für die Aktivierung von c-Met.	13
I.10:	Phosphorylierte Formen der Aminosäure-Seitenketten von Serin, Threonin, Tyrosin, Histidin und Asparaginsäure.	14
I.11:	Phylogenetisches Dendrogramm der 478 typischen Proteinkinasen.	16
I.12:	Das Prinzip der IMAC-Chromatographie.	20
I.13:	Serin- und Threonin-haltige Phosphopeptidionen verlieren im MS/MS-Modus neutrale Phosphorsäure (H ₃ PO ₄).	21
I.14:	Die vier Isotopen-markierten iTRAQ TM -Reagenzien.	24
I.15:	iTRAQ TM ermöglicht den Vergleich von vier verschiedenen Ansätzen.	25

I.16:	Der theoretische Verdau der über 500 humanen Protein-kinasen mit der Endoprotease Trypsin generiert nur ca. 1.8% aller möglichen tryptischen Peptide im humanen Proteom.	26
I.17:	Modell der Interaktion der katalytischen PKA-Untereinheit mit dem niedermolekularen Inhibitor H-8 basierend auf Röntgen-Strukturanalysen.	26
I.18:	Proteinkinase-Inhibitoren, die zur Affinitätsreinigung zellulärer Kinasen eingesetzt wurden.	27

Ergebnisse

III.1:	Experimentelle Strategie zur quantitativen Analyse differentieller Phosphorylierungen an Kinasen nach Aktivierung von c-Met.	31
III.2:	SAR-basierte Entwicklung des Kinase-Inhibitors PP58.	32
III.3:	Der Einfluss des Threonin T ³⁴¹ von c-Src auf die PP58-Bindung.	33
III.4:	Strukturunterschiede von PP58 und V16743.	34
III.5:	Die 2-Anilino-Gruppe von PD173955 ist nicht an der Interaktion zur ATP-Bindungstasche beteiligt.	35
III.6:	Die Struktur des immobilisierten ATP-kompetitiven Kinase-Inhibitors V16743.	36
III.7:	Anzahl und Aufteilung der signifikant identifizierten Proteine im Eluat der V16743-Affinitäts-Chromatographie.	37
III.8:	Kinasen wurden im Durchschnitt besser identifiziert als Proteine ohne Kinase-Aktivität.	38
III.9:	Einteilung der identifizierten Proteinkinasen nach Aminosäure-Substrat.	40
III.10:	Die Klassifizierung der V16743-affinen Proteinkinasen nach dem phylogenetischen Stammbaum von Manning.	41
III.11:	Verteilung der Gatekeeper-Aminosäure unter V16743-affinen Kinasen.	42
III.12:	V16743-affine Proteine ohne bekannte Kinase-Aktivität.	44
III.13:	Ausschnitt aus einem Mascot-Suchergebnis eines Phosphopeptid-angereicherten IMAC-Eluates.	46
III.14:	Anzahl und Verteilung der Phosphorylierungs-Stellen, die in Proteinen der Kinase-Familie bzw. in Proteinen ohne Kinase-Aktivität identifiziert wurden.	47
III.15:	Rekombinant hergestelltes InlB ₃₂₁ .	48
III.16:	c-Met wird in HeLa S3- und DU-145-Zellen exprimiert.	49
III.17:	Die Aktivierung von prozessiertem c-Met durch InlB ₃₂₁ in den Zelllinien HeLa S3 und DU-145.	50

III.18:	Das InIB-Derivat InIB ₃₂₁ aktiviert den MAP-Kinase- und den PI3K/Akt1(PKB)-Signalweg in der c-Met-Signalkaskade.	52
III.19:	Fragmentionen-Spektrum des Tyrosin-phosphorylierten Peptides GEPNVSpYICSR der Kinase GSK3A.	55
III.20:	Fragmentionen-Spektrum des Serin-phosphorylierten Peptides TS _{pS} FAEPGGGGGGGGGGPGGSASGPGGTGG der Kinase GSK3A.	56
III.21:	Flussdiagramm der Regulationsanalyse iTRAQ TM -markierter Peptide durch das Programm iTRAQassist.	57
III.22:	Graphische Darstellung der iTRAQassist-basierten Regulationsanalyse der Kinase GSK3A nach vierminütiger InIB ₃₂₁ -Stimulation.	59
III.23:	Massenspektrometrische Quantifizierung Phosphorylierung im Bereich der Kinase-Domäne von Erk2 (MK01) und Erk1 (MK03) nach vierminütiger InIB ₃₂₁ -Präsentation.	61
III.24:	Massenspektrometrische Quantifizierung der regulatorischen Phosphorylierung an Serin S ²¹ bzw. S ⁹ der Kinasen GSK3A und GSK3B nach vierminütiger Stimulation der Zellen mit InIB ₃₂₁ .	62
III.25:	Regulierte Phosphorylierungs-Stellen an Kinasen nach InIB ₃₂₁ -Stimulation.	63
III.26:	Die Regulationskurven der Kinase RSK-2 (KS6A3) nach vierminütiger InIB ₃₂₁ -Aktivierung von HeLa S3-Zellen.	64
III.27:	InIB ₃₂₁ induziert die Phosphorylierung des Threonins T ³³³ der Kinase Nek9.	65
III.28:	C-terminal mit einem StrepTagII fusionierte rekombinant hergestellte InIB ₃₂₁ -Konstrukte.	68
III.29:	Der Austausch der fünf aromatischen Aminosäuren in den Leucin-reichen Sequenzen von InIB ₃₂₁ verhindert die Aktivierung der c-Met-Signalkaskade.	69
III.30:	Zwei InIB ₃₂₁ /StrepII ^C WT-abhängig gegensätzlich regulierte phosphorylierte Peptide im Protein CDK5 und ABL1 Enzym Substrat1 (CABL1).	71
III.31:	Der in der Maus-Myelom-Zelllinie NSO rekombinant exprimierte humane Wachstumsfaktor HGF/SF.	73
III.32:	HGF/SF-Aktivierung der c-Met-Signalkaskade.	75
III.33:	HGF/SF induziert die inhibitorisch wirkenden Phosphorylierungen an den Serinen S ²¹ und S ⁹ der Kinasen GSK3A und GSK3B.	77
III.34:	HGF/SF induziert differentielle Phosphorylierungen in der Serin/Threonin-Kinase Nek9.	77

III.35:	HGF/SF-induzierte Regulation des phosphorylierten Peptides SS ^{ps} ⁶³⁷ PTQYGLTK der MAP-Kinase MLTK.	78
III.36:	Änderung der Protein-Regulation nach Aktivierung der c-Met-Signalkaskade.	80
III.37:	HGF/SF-spezifische Änderungen in der Proteinregulation der MAP-Kinase MP2K6.	81
III.38:	Differentielle Proteinregulation von Prohibitin und Prohibitin-2.	82
III.39:	Proteinbanden-Muster im α -Nek9-pAB-Immunopräzipitat.	83
III.40:	InIB ₃₂₁ -Stimulation beeinflusst das Bandenmuster des α -Nek9-pAB-Immunopräzipitats.	84
III.41:	Zur Proteinidentifizierung ausgewählte Gelbereiche eines eindimensional getrennten Eluates einer α -Nek9-pAB-Immunopräzipitation.	85
III.42:	Der Einfluss von InIB ₃₂₁ auf die cytosolische Lokalisation von Nek9.	88
III.43:	Zwei AGC-Kinase-Motive in Nek9 und deren Oberflächenzugänglichkeit.	89
III.44:	Abnahme des Nek9 Signals in der AGC-Kinase-Motif-spezifischen Immunopräzipitation.	90
III.45:	Dosis-abhängige Inhibierung der Akt1(PKB)-Kinase im InIB ₃₂₁ -stimulierten c-Met-Signalweg.	92
III.46:	Dosis-abhängige Inhibierung der Mek1/2-Kinasen im InIB ₃₂₁ -stimulierten c-Met-Signalweg.	93
III.47:	Experimentelle Strategie zur Charakterisierung des Einflusses der MAP-Kinase- und der PI3-Kinase-Signalübertragung auf die Phosphorylierung von Threonin T ³³³ der Kinase Nek9.	94
III.48:	Der Einfluss der Inhibierung der PI3-Kinase auf die Threonin T ³³³ -Phosphorylierung von Nek9.	95
III.49:	Der Einfluss der Mek1/2-Inhibierung auf die Threonin T ³³³ -Phosphorylierung von Nek9.	97

Diskussion

IV.1:	Lage der nach InIB ₃₂₁ -Aktivierung der c-Met-Signalkaskade regulierten Phosphorylierungen an Kinasen bezogen auf die Kinase-Domäne.	112
IV.2:	Sequenzvergleich der Kinasen der RIO-Familie in Mensch, Maus, Fruchtfliege, Wurm und Hefe.	116
IV.3:	Zusammenfassung der in dieser Arbeit identifizierten differentiell phosphorylierten Kinasen im InIB ₃₂₁ -aktivierten c-Met-Signalweg.	118
IV.4:	Domänen-Aufbau der Serin/Threonin-Kinase Nek9.	119

IV.5:	Forciert InlB eine Relokalisation von Nek9 im c-Met-Signalweg?	124
-------	--	-----

3. Literaturverzeichnis

- Aberger, F., Weidinger, G., and Richter, K. (1997). A member of the Met/HGF-receptor family is expressed in a BMP-4-like pattern in the ectoderm of *Xenopus* gastrulae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**, 191-195.
- Amanchy, R., Kalume, D.E., Iwahori, A., Zhong, J., and Pandey, A. (2005). Phosphoproteome analysis of HeLa cells using stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC). *J. Proteome. Res.* **4**, 1661-1671.
- Andersson, L. and Porath, J. (1986). Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe³⁺) affinity chromatography. *Anal. Biochem.* **154**, 250-254.
- Angermayr, M., Roidl, A., and Bandlow, W. (2002). Yeast Rio1p is the founding member of a novel subfamily of protein serine kinases involved in the control of cell cycle progression. *Mol. Microbiol.* **44**, 309-324.
- Anjum, R., Roux, P.P., Ballif, B.A., Gygi, S.P., and Blenis, J. (2005). The tumor suppressor DAP kinase is a target of RSK-mediated survival signaling. *Curr. Biol.* **15**, 1762-1767.
- Arokium, H., Ouerfelli, H., Velours, G., Camougrand, N., Vallette, F.M., and Manon, S. (2007). Substitutions of potentially phosphorylatable serine residues of bax reveal how they may regulate its interaction with mitochondria. *J. Biol. Chem.* **282**, 35104-35112.
- Ashraf, S.I. and Ip, Y.T. (1998). Transcriptional control: repression by local chromatin modification. *Curr. Biol.* **8**, R683-R686.
- Ballif, B.A., Roux, P.P., Gerber, S.A., MacKeigan, J.P., Blenis, J., and Gygi, S.P. (2005). Quantitative phosphorylation profiling of the ERK/p90 ribosomal S6 kinase-signaling cassette and its targets, the tuberous sclerosis tumor suppressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 667-672.
- Banerjee, M., Copp, J., Vuga, D., Marino, M., Chapman, T., van der, G.P., and Ghosh, P. (2004). GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are required for potentiation of Met activation. *Mol. Microbiol.* **52**, 257-271.
- Barvian, M., Boschelli, D.H., Cossrow, J., Dobrusin, E., Fattaey, A., Fritsch, A., Fry, D., Harvey, P., Keller, P., Garrett, M., La, F., Leopold, W., McNamara, D., Quin, M., Trumpf-Kallmeyer, S., Toogood, P., Wu, Z., and Zhang, E. (2000). Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one inhibitors of cyclin-dependent kinases. *J. Med. Chem.* **43**, 4606-4616.
- Basar, T., Shen, Y., and Ireton, K. (2005). Redundant roles for Met docking site tyrosines and the Gab1 pleckstrin homology domain in InlB-mediated entry of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **73**, 2061-2074.
- Beausoleil, S.A., Jedrychowski, M., Schwartz, D., Elias, J.E., Villen, J., Li, J., Cohn, M.A., Cantley, L.C., and Gygi, S.P. (2004). Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 12130-12135.
- Belham, C., Roig, J., Caldwell, J.A., Aoyama, Y., Kemp, B.E., Comb, M., and Avruch, J. (2003). A mitotic cascade of NIMA family kinases. Ncc1/Nek9 activates the Nek6 and Nek7 kinases. *J. Biol. Chem.* **278**, 34897-34909.
- Bendt, A.K., Burkovski, A., Schaffer, S., Bott, M., Farwick, M., and Hermann, T. (2003). Towards a phosphoproteome map of *Corynebacterium glutamicum*. *Proteomics* **3**, 1637-1646.
- Bertotti, A. and Comoglio, P.M. (2003). Tyrosine kinase signal specificity: lessons from the HGF receptor. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 527-533.

Bierne,H. and Cossart,P. (2002). InlB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and a growth factor. *J. Cell Sci.* 115, 3357-3367.

Bierne,H., Gouin,E., Roux,P., Caroni,P., Yin,H.L., and Cossart,P. (2001). A role for cofilin and LIM kinase in *Listeria*-induced phagocytosis. *J. Cell Biol.* 155, 101-112.

Bierne,H., Mazmanian,S.K., Trost,M., Pucciarelli,M.G., Liu,G., Dehoux,P., Jansch,L., Garcia-del Portillo,F., Schneewind,O., and Cossart,P. (2002). Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. *Mol. Microbiol.* 43, 869-881.

Bierne,H., Miki,H., Innocenti,M., Scita,G., Gertler,F.B., Takenawa,T., and Cossart,P. (2005). WASP-related proteins, Abi1 and Ena/VASP are required for *Listeria* invasion induced by the Met receptor. *J. Cell Sci.* 118, 1537-1547.

Birchmeier,C., Birchmeier,W., Gherardi,E., and Vande Woude,G.F. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 915-925.

Blagoev,B., Ong,S.E., Kratchmarova,I., and Mann,M. (2004). Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling networks by quantitative proteomics. *Nat. Biotechnol.* 22, 1139-1145.

Blencke,S., Ullrich,A., and Daub,H. (2003). Mutation of threonine 766 in the epidermal growth factor receptor reveals a hotspot for resistance formation against selective tyrosine kinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 278, 15435-15440.

Blencke,S., Zech,B., Engkvist,O., Greff,Z., Orfi,L., Horvath,Z., Keri,G., Ullrich,A., and Daub,H. (2004). Characterization of a conserved structural determinant controlling protein kinase sensitivity to selective inhibitors. *Chem. Biol.* 11, 691-701.

Blom,N., Sicheritz-Ponten,T., Gupta,R., Gammeltoft,S., and Brunak,S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4, 1633-1649.

Boeri,E.E., Bergatto,E., Cabodi,S., Silengo,L., Tarone,G., Defilippi,P., and Jensen,O.N. (2005). Systematic analysis of the epidermal growth factor receptor by mass spectrometry reveals stimulation-dependent multisite phosphorylation. *Mol. Cell Proteomics* 4, 1107-1121.

Bose,R., Molina,H., Patterson,A.S., Bitok,J.K., Periaswamy,B., Bader,J.S., Pandey,A., and Cole,P.A. (2006). Phosphoproteomic analysis of Her2/neu signaling and inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9773-9778.

Bosse,T., Ehinger,J., Czuchra,A., Benesch,S., Steffen,A., Wu,X., Schloen,K., Niemann,H.H., Scita,G., Stradal,T.E., Brakebusch,C., and Rottner,K. (2007). Cdc42 and phosphoinositide 3-kinase drive Rac-mediated actin polymerization downstream of c-Met in distinct and common pathways. *Mol. Cell Biol.* 27, 6615-6628.

Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Braun,L., Dramsi,S., Dehoux,P., Bierne,H., Lindahl,G., and Cossart,P. (1997). InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol. Microbiol.* 25, 285-294.

Braun,L., Ghebrehiwet,B., and Cossart,P. (2000). gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* 19, 1458-1466.

Braun,L., Nato,F., Payrastra,B., Mazie,J.C., and Cossart,P. (1999). The 213-amino-acid leucine-rich repeat region of the *Listeria monocytogenes* InlB protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI 3-kinase and membrane ruffling. *Mol. Microbiol.* 34, 10-23.

Braun,L., Ohayon,H., and Cossart,P. (1998). The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol. Microbiol.* 27, 1077-1087.

- Breed, S.R., Murray, E.G.D., and Parker, H.A. (1948). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 23, 265-266.
- Brehmer, D., Greff, Z., Godl, K., Blencke, S., Kurtenbach, A., Weber, M., Muller, S., Klebl, B., Cotten, M., Keri, G., Wissing, J., and Daub, H. (2005). Cellular targets of gefitinib. *Cancer Res.* 65, 379-382.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., and Righetti, P.G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25, 1327-1333.
- Canovas, P.M. and Guadagno, T.M. (2007). Functional analysis of Survivin in spindle assembly in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biochem.* 100, 217-229.
- Carter, S., Urbe, S., and Clague, M.J. (2004). The met receptor degradation pathway: requirement for Lys48-linked polyubiquitin independent of proteasome activity. *J. Biol. Chem.* 279, 52835-52839.
- Chan, A.M., King, H.W., Deakin, E.A., Tempest, P.R., Hilken, J., Kroezen, V., Edwards, D.R., Wills, A.J., Brookes, P., and Cooper, C.S. (1988). Characterization of the mouse met proto-oncogene. *Oncogene* 2, 593-599.
- Cohen, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* 25, 596-601.
- Cohen, P. (2002). Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? 33. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 309-315.
- Cooper, C.S., Park, M., Blair, D.G., Tainsky, M.A., Huebner, K., Croce, C.M., and Vande Woude, G.F. (1984). Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 311, 29-33.
- Copp, J., Marino, M., Banerjee, M., Ghosh, P., and van der, G.P. (2003). Multiple regions of internalin B contribute to its ability to turn on the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 7783-7789.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- Crute, B.E., Seefeld, K., Gamble, J., Kemp, B.E., and Witters, L.A. (1998). Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 35347-35354.
- Cuenda, A., Alonso, G., Morrice, N., Jones, M., Meier, R., Cohen, P., and Nebreda, A.R. (1996). Purification and cDNA cloning of SAPKK3, the major activator of RK/p38 in stress- and cytokine-stimulated monocytes and epithelial cells. *EMBO J.* 15, 4156-4164.
- Dabiri, G.A., Sanger, J.M., Portnoy, D.A., and Southwick, F.S. (1990). *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 6068-6072.
- Dalby, K.N., Morrice, N., Caudwell, F.B., Avruch, J., and Cohen, P. (1998). Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK. *J. Biol. Chem.* 273, 1496-1505.
- Daub, H., Godl, K., Brehmer, D., Klebl, B., and Muller, G. (2004). Evaluation of kinase inhibitor selectivity by chemical proteomics. *Assay. Drug Dev. Technol.* 2, 215-224.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M., and Cohen, P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* 351, 95-105.
- Dickneite, C., Bockmann, R., Spory, A., Goebel, W., and Sokolovic, Z. (1998). Differential interaction of the transcription factor PrfA and the PrfA-activating factor (Paf) of *Listeria monocytogenes* with target sequences. *Mol. Microbiol.* 27, 915-928.

- Diella, F., Cameron, S., Gemund, C., Linding, R., Via, A., Kuster, B., Sicheritz-Ponten, T., Blom, N., and Gibson, T.J. (2004). Phospho.ELM: a database of experimentally verified phosphorylation sites in eukaryotic proteins. *BMC. Bioinformatics.* 5, 79.
- Doganay, M. (2003). Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35, 173-175.
- Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P., and Cossart, P. (1995). Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol. Microbiol.* 16, 251-261.
- Dramsi, S., Bourdichon, F., Cabanes, D., Lecuit, M., Fsihi, H., and Cossart, P. (2004). FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Mol. Microbiol.* 53, 639-649.
- Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89, 297-308.
- Dyck, J.R., Gao, G., Widmer, J., Stapleton, D., Fernandez, C.S., Kemp, B.E., and Witters, L.A. (1996). Regulation of 5'-AMP-activated protein kinase activity by the noncatalytic beta and gamma subunits. *J. Biol. Chem.* 271, 17798-17803.
- Engh, R.A., Girod, A., Kinzel, V., Huber, R., and Bossemeyer, D. (1996). Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase inhibitors H7, H8, and H89. Structural implications for selectivity. *J. Biol. Chem.* 271, 26157-26164.
- Eyers, P.A., Craxton, M., Morrice, N., Cohen, P., and Goedert, M. (1998). Conversion of SB 203580-insensitive MAP kinase family members to drug-sensitive forms by a single amino-acid substitution. *Chem. Biol.* 5, 321-328.
- Fan, S., Meng, Q., Laterra, J.J., and Rosen, E.M. (2007). Ras effector pathways modulate scatter factor-stimulated NF-kappaB signaling and protection against DNA damage. *Oncogene* 26, 4774-4796.
- Ficarro, S.B., McClelland, M.L., Stukenberg, P.T., Burke, D.J., Ross, M.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and White, F.M. (2002). Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotechnol.* 20, 301-305.
- Force, T., Kuida, K., Namchuk, M., Parang, K., and Kyriakis, J.M. (2004). Inhibitors of protein kinase signaling pathways: emerging therapies for cardiovascular disease. *Circulation* 109, 1196-1205.
- Forrest, A.R., Taylor, D., and Grimmond, S. (2003). Exploration of the cell-cycle genes found within the RIKEN FANTOM2 data set. *Genome Res.* 13, 1366-1375.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., and Toker, A. (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275, 665-668.
- Fujita, N., Sato, S., and Tsuruo, T. (2003). Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J. Biol. Chem.* 278, 49254-49260.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., and Cossart, P. (1991). Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 65, 1127-1141.
- Geerlings, T.H., Faber, A.W., Bister, M.D., Vos, J.C., and Raue, H.A. (2003). Rio2p, an evolutionarily conserved, low abundant protein kinase essential for processing of 20 S Pre-rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 22537-22545.
- Geoffroy, C., Gaillard, J.L., Alouf, J.E., and Berche, P. (1987). Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 55, 1641-1646.

Ghebrehiwet,B., Lim,B.L., Kumar,R., Feng,X., and Peerschke,E.I. (2001). gC1q-R/p33, a member of a new class of multifunctional and multicompartmental cellular proteins, is involved in inflammation and infection. *Immunol. Rev.* 180, 65-77.

Gibson,B.W. and Cohen,P. (1990). Liquid secondary ion mass spectrometry of phosphorylated and sulfated peptides and proteins. *Methods Enzymol.* 193, 480-501.

Glaser,P., Frangeul,L., Buchrieser,C., Rusniok,C., Amend,A., Baquero,F., Berche,P., Bloecker,H., Brandt,P., Chakraborty,T., Charbit,A., Chetouani,F., Couve,E., de Daruvar,A., Dehoux,P., Domann,E., Dominguez-Bernal,G., Duchaud,E., Durant,L., Dussurget,O., Entian,K.D., Fsihi,H., Garcia-del Portillo,F., Garrido,P., Gautier,L., Goebel,W., Gomez-Lopez,N., Hain,T., Hauf,J., Jackson,D., Jones,L.M., Kaerst,U., Kreft,J., Kuhn,M., Kunst,F., Kurapkat,G., Madueno,E., Maitournam,A., Vicente,J.M., Ng,E., Nedjari,H., Nordsiek,G., Novella,S., de Pablos,B., Perez-Diaz,J.C., Purcell,R., Remmel,B., Rose,M., Schlueter,T., Simoes,N., Tierrez,A., Vazquez-Boland,J.A., Voss,H., Wehland,J., and Cossart,P. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294, 849-852.

Godl,K., Wissing,J., Kurtenbach,A., Habenberger,P., Blencke,S., Gutbrod,H., Salassidis,K., Stein-Gerlach,M., Missio,A., Cotten,M., and Daub,H. (2003). An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 15434-15439.

Gong,R., Rifai,A., and Dworkin,L.D. (2005). Activation of PI3K-Akt-GSK3beta pathway mediates hepatocyte growth factor inhibition of RANTES expression in renal tubular epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 27-33.

Goshe,M.B. (2006). Characterizing phosphoproteins and phosphoproteomes using mass spectrometry. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 4, 363-376.

Gotoh,I., Adachi,M., and Nishida,E. (2001). Identification and characterization of a novel MAP kinase kinase kinase, MLTK. *J. Biol. Chem.* 276, 4276-4286.

Greiffenberg,L., Goebel,W., Kim,K.S., Weiglein,I., Bubert,A., Engelbrecht,F., Stins,M., and Kuhn,M. (1998). Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. *Infect. Immun.* 66, 5260-5267.

Gruhler,A., Olsen,J.V., Mohammed,S., Mortensen,P., Faergeman,N.J., Mann,M., and Jensen,O.N. (2005). Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Mol. Cell Proteomics* 4, 310-327.

Guzman,C.A., Rohde,M., Chakraborty,T., Domann,E., Hudel,M., Wehland,J., and Timmis,K.N. (1995). Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells. *Infect. Immun.* 63, 3665-3673.

Gygi,S.P., Rist,B., Gerber,S.A., Turecek,F., Gelb,M.H., and Aebersold,R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* 17, 994-999.

Hain,T., Chatterjee,S.S., Ghai,R., Kuenne,C.T., Billion,A., Steinweg,C., Domann,E., Karst,U., Jansch,L., Wehland,J., Eisenreich,W., Bacher,A., Joseph,B., Schar,J., Kreft,J., Klumpp,J., Loessner,M.J., Dorscht,J., Neuhaus,K., Fuchs,T.M., Scherer,S., Doumith,M., Jacquet,C., Martin,P., Cossart,P., Rusniok,C., Glaser,P., Buchrieser,C., Goebel,W., and Chakraborty,T. (2007). Pathogenomics of *Listeria* spp. *Int. J. Med. Microbiol.*

Hamon,M., Bierne,H., and Cossart,P. (2006). *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 423-434.

Hanks,S.K. and Hunter,T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9, 576-596.

Hardie,D.G., Salt,I.P., Hawley,S.A., and Davies,S.P. (1999). AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge. *Biochem. J.* 338 (Pt 3), 717-722.

Hardie,D.G., Scott,J.W., Pan,D.A., and Hudson,E.R. (2003). Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.* 546, 113-120.

- Harvey, H.A., Jennings, M.P., Campbell, C.A., Williams, R., and Apicella, M.A. (2001). Receptor-mediated endocytosis of *Neisseria gonorrhoeae* into primary human urethral epithelial cells: the role of the asialoglycoprotein receptor. *Mol. Microbiol.* **42**, 659-672.
- Hauge, C. and Frodin, M. (2006). RSK and MSK in MAP kinase signalling. *J. Cell Sci.* **119**, 3021-3023.
- Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Carling, D., and Hardie, D.G. (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 27879-27887.
- Haydon, C.E., Evers, P.A., Aveline-Wolf, L.D., Resing, K.A., Maller, J.L., and Ahn, N.G. (2003). Identification of novel phosphorylation sites on *Xenopus laevis* Aurora A and analysis of phosphopeptide enrichment by immobilized metal-affinity chromatography. *Mol. Cell Proteomics* **2**, 1055-1067.
- Hoch, J.A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 165-170.
- Hof, H., Nichterlein, T., and Kretschmar, M. (1997). Management of listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 345-357.
- Hoffmann, K.M., Tapia, J.A., Berna, M.J., Thill, M., Braunschweig, T., Mantey, S.A., Moody, T.W., and Jensen, R.T. (2006). Gastrointestinal hormones cause rapid c-Met receptor down-regulation by a novel mechanism involving clathrin-mediated endocytosis and a lysosome-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **281**, 37705-37719.
- Holland, P.M., Milne, A., Garka, K., Johnson, R.S., Willis, C., Sims, J.E., Rauch, C.T., Bird, T.A., and Virca, G.D. (2002). Purification, cloning, and characterization of Nek8, a novel NIMA-related kinase, and its candidate substrate Bicd2. *J. Biol. Chem.* **277**, 16229-16240.
- Holmes, O., Pillozzi, S., Deakin, J.A., Carafoli, F., Kemp, L., Butler, P.J., Lyon, M., and Gherardi, E. (2007). Insights into the structure/function of hepatocyte growth factor/scatter factor from studies with individual domains. *J. Mol. Biol.* **367**, 395-408.
- Horman, S., Vertommen, D., Heath, R., Neumann, D., Mouton, V., Woods, A., Schlattner, U., Wallimann, T., Carling, D., Hue, L., and Rider, M.H. (2006). Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. *J. Biol. Chem.* **281**, 5335-5340.
- Inagaki, M., Watanabe, M., and Hidaka, H. (1985). N-(2-Aminoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide, a newly synthesized protein kinase inhibitor, functions as a ligand in affinity chromatography. Purification of Ca²⁺-activated, phospholipid-dependent and other protein kinases. *J. Biol. Chem.* **260**, 2922-2925.
- Ireton, K., Payrastre, B., Chap, H., Ogawa, W., Sakaue, H., Kasuga, M., and Cossart, P. (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science* **274**, 780-782.
- Ireton, K., Payrastre, B., and Cossart, P. (1999). The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 17025-17032.
- Ishibe, S., Haydu, J.E., Togawa, A., Marlier, A., and Cantley, L.G. (2006). Cell confluence regulates hepatocyte growth factor-stimulated cell morphogenesis in a beta-catenin-dependent manner. *Mol. Cell Biol.* **26**, 9232-9243.
- Jeffers, M., Taylor, G.A., Weidner, K.M., Omura, S., and Vande Woude, G.F. (1997). Degradation of the Met tyrosine kinase receptor by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol. Cell Biol.* **17**, 799-808.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., and Cossart, P. (2002). An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* **110**, 551-561.
- Jones, A.M., Bennett, M.H., Mansfield, J.W., and Grant, M. (2006). Analysis of the defence phosphoproteome of *Arabidopsis thaliana* using differential mass tagging. *Proteomics* **6**, 4155-4165.

Jonquieres,R., Bierne,H., Fiedler,F., Gounon,P., and Cossart,P. (1999). Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **34**, 902-914.

Jonquieres,R., Pizarro-Cerda,J., and Cossart,P. (2001). Synergy between the N- and C-terminal domains of InlB for efficient invasion of non-phagocytic cells by *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **42**, 955-965.

Kermorgant,S. and Parker,P.J. (2005). c-Met signalling: spatio-temporal decisions. *Cell Cycle* **4**, 352-355.

Khelef,N., Lecuit,M., Bierne,H., and Cossart,P. (2006). Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InlB protein. *Cell Microbiol.* **8**, 457-470.

Kirchhofer,D., Yao,X., Peek,M., Eigenbrot,C., Lipari,M.T., Billeci,K.L., Maun,H.R., Moran,P., Santell,L., Wiesmann,C., and Lazarus,R.A. (2004). Structural and functional basis of the serine protease-like hepatocyte growth factor beta-chain in Met binding and signaling. *J. Biol. Chem.* **279**, 39915-39924.

Klutcho,S.R., Hamby,J.M., Boschelli,D.H., Wu,Z., Kraker,A.J., Amar,A.M., Hartl,B.G., Shen,C., Klohs,W.D., Steinkampf,R.W., Driscoll,D.L., Nelson,J.M., Elliott,W.L., Roberts,B.J., Stoner,C.L., Vincent,P.W., Dykes,D.J., Panek,R.L., Lu,G.H., Major,T.C., Dahring,T.K., Hallak,H., Bradford,L.A., Showalter,H.D., and Doherty,A.M. (1998). 2-Substituted aminopyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-ones. structure-activity relationships against selected tyrosine kinases and in vitro and in vivo anticancer activity. *J. Med. Chem.* **41**, 3276-3292.

Koh,H. and Chung,J. (2007). AMPK links energy status to cell structure and mitosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 789-792.

Komada,M., Hatsuzawa,K., Shibamoto,S., Ito,F., Nakayama,K., and Kitamura,N. (1993). Proteolytic processing of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor by furin. *FEBS Lett.* **328**, 25-29.

Kong-Beltran,M., Stamos,J., and Wickramasinghe,D. (2004). The Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation. *Cancer Cell* **6**, 75-84.

Kreft,J., Vazquez-Boland,J.A., Altmann,S., Dominguez-Bernal,G., and Goebel,W. (2002). Pathogenicity islands and other virulence elements in *Listeria*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **264**, 109-125.

Krishna,R.G.a.W.F. (1997). Identification of common post-translational modifications. In: *Protein Structure - a practical approach* (T.E.Creighton, ed.; New York: pp. 91-116).

Kuhn,M. (1998). The microtubule depolymerizing drugs nocodazole and colchicine inhibit the uptake of *Listeria monocytogenes* by P388D1 macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**, 87-90.

Kurihara,A., Nagoshi,H., Yabuki,M., Okuyama,R., Obinata,M., and Ikawa,S. (2007). Ser46 phosphorylation of p53 is not always sufficient to induce apoptosis: multiple mechanisms of regulation of p53-dependent apoptosis. *Genes Cells* **12**, 853-861.

Kusmann,M., Hauser,K., Kissmehl,R., Breed,J., Plattner,H., and Roepstorff,P. (1999). Comparison of in vivo and in vitro phosphorylation of the exocytosis-sensitive protein PP63/parafusin by differential MALDI mass spectrometric peptide mapping. *Biochemistry* **38**, 7780-7790.

Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Larsen,M.R., Thingholm,T.E., Jensen,O.N., Roepstorff,P., and Jorgensen,T.J. (2005). Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol. Cell Proteomics* **4**, 873-886.

- Lecuit,M., Nelson,D.M., Smith,S.D., Khun,H., Huerre,M., Vacher-Lavenu,M.C., Gordon,J.I., and Cossart,P. (2004). Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 6152-6157.
- Lecuit,M., Vandormael-Pournin,S., Lefort,J., Huerre,M., Gounon,P., Dupuy,C., Babinet,C., and Cossart,P. (2001). A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 292, 1722-1725.
- Lee,J.H., Koh,H., Kim,M., Kim,Y., Lee,S.Y., Karess,R.E., Lee,S.H., Shong,M., Kim,J.M., Kim,J., and Chung,J. (2007). Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature* 447, 1017-1020.
- Li,N., Xiang,G.S., Dokainish,H., Ireton,K., and Elferink,L.A. (2005). The *Listeria* protein internalin B mimics hepatocyte growth factor-induced receptor trafficking. *Traffic*. 6, 459-473.
- Lin,C.H., Platt,M.D., Ficarro,S.B., Hoofnagle,M.H., Shabanowitz,J., Comai,L., Hunt,D.F., and Owens,G.K. (2007). Mass spectrometric identification of phosphorylation sites of rRNA transcription factor upstream binding factor. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 292, C1617-C1624.
- Lingnau,A., Domann,E., Hudel,M., Bock,M., Nichterlein,T., Wehland,J., and Chakraborty,T. (1995). Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect. Immun.* 63, 3896-3903.
- Liu,S., Lu,W., Obara,T., Kuida,S., Lehoczky,J., Dewar,K., Drummond,I.A., and Beier,D.R. (2002). A defect in a novel Nek-family kinase causes cystic kidney disease in the mouse and in zebrafish. *Development* 129, 5839-5846.
- Liu,T., Donahue,K.C., Hu,J., Kurnellas,M.P., Grant,J.E., Li,H., and Elkabes,S. (2007). Identification of differentially expressed proteins in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by proteomic analysis of the spinal cord. *J. Proteome. Res.* 6, 2565-2575.
- Lizcano,J.M., Goransson,O., Toth,R., Deak,M., Morrice,N.A., Boudeau,J., Hawley,S.A., Udd,L., Makela,T.P., Hardie,D.G., and Alessi,D.R. (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* 23, 833-843.
- Longati,P., Bardelli,A., Ponzetto,C., Naldini,L., and Comoglio,P.M. (1994). Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene* 9, 49-57.
- Lyon,M., Deakin,J.A., and Gallagher,J.T. (2002). The mode of action of heparan and dermatan sulfates in the regulation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *J. Biol. Chem.* 277, 1040-1046.
- Lyon,M., Deakin,J.A., Lietha,D., Gherardi,E., and Gallagher,J.T. (2004). The interactions of hepatocyte growth factor/scatter factor and its NK1 and NK2 variants with glycosaminoglycans using a modified gel mobility shift assay. Elucidation of the minimal size of binding and activatory oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 279, 43560-43567.
- Machner,M.P., Frese,S., Schubert,W.D., Orian-Rousseau,V., Gherardi,E., Wehland,J., Niemann,H.H., and Heinz,D.W. (2003). Aromatic amino acids at the surface of InlB are essential for host cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 48, 1525-1536.
- Mann,M., Ong,S.E., Gronborg,M., Steen,H., Jensen,O.N., and Pandey,A. (2002). Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol.* 20, 261-268.
- Manning,G., Whyte,D.B., Martinez,R., Hunter,T., and Sudarsanam,S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.

Mansour, S.J., Resing, K.A., Candi, J.M., Hermann, A.S., Gloor, J.W., Herskind, K.R., Wartmann, M., Davis, R.J., and Ahn, N.G. (1994). Mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphorylation of MAP kinase kinase: determination of phosphorylation sites by mass spectrometry and site-directed mutagenesis. *J. Biochem. (Tokyo)* **116**, 304-314.

Mari, F., Azimonti, S., Bertani, I., Bolognese, F., Colombo, E., Caselli, R., Scala, E., Longo, I., Grosso, S., Pescucci, C., Ariani, F., Hayek, G., Balestri, P., Bergo, A., Badaracco, G., Zappella, M., Broccoli, V., Renieri, A., Kilstrup-Nielsen, C., and Landsberger, N. (2005). CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 1935-1946.

Marino, M., Banerjee, M., Jonquieres, R., Cossart, P., and Ghosh, P. (2002). GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are SH3-like and mediate binding to host ligands. *EMBO J.* **21**, 5623-5634.

Marino, M., Braun, L., Cossart, P., and Ghosh, P. (2000). A framework for interpreting the leucine-rich repeats of the *Listeria internalins*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 8784-8788.

Martin, K., Steinberg, T.H., Cooley, L.A., Gee, K.R., Beechem, J.M., and Patton, W.F. (2003). Quantitative analysis of protein phosphorylation status and protein kinase activity on microarrays using a novel fluorescent phosphorylation sensor dye. *Proteomics* **3**, 1244-1255.

Matsumoto, K. and Nakamura, T. (2005). Mechanisms and significance of bifunctional NK4 in cancer treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**, 316-327.

Maulik, G., Shrikhande, A., Kijima, T., Ma, P.C., Morrison, P.T., and Salgia, R. (2002). Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**, 41-59.

McClung, J.K., Danner, D.B., Stewart, D.A., Smith, J.R., Schneider, E.L., Lumpkin, C.K., Dell'Orco, R.T., and Nuell, M.J. (1989). Isolation of a cDNA that hybrid selects antiproliferative mRNA from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 1316-1322.

Mengaud, J., Dramsi, S., Gouin, E., Vazquez-Boland, J.A., Milon, G., and Cossart, P. (1991). Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol. Microbiol.* **5**, 2273-2283.

Merrick, B.A., Pence, P.M., He, C., Patterson, R.M., and Selkirk, J.K. (1995). Phosphor image analysis of human p53 protein isoforms. *Biotechniques* **18**, 292-299.

Mikalsen, T., Gerits, N., and Moens, U. (2006). Inhibitors of signal transduction protein kinases as targets for cancer therapy. *Biotechnol. Annu. Rev.* **12**, 153-223.

Mishra, S., Murphy, L.C., and Murphy, L.J. (2006). The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J. Cell Mol. Med.* **10**, 353-363.

Miyazawa, K., Tsubouchi, H., Naka, D., Takahashi, K., Okigaki, M., Arakaki, N., Nakayama, H., Hirano, S., Sakiyama, O., Takahashi, K., and . (1989). Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 967-973.

Moloney, G.P., Robertson, A.D., Martin, G.R., MacLennan, S., Mathews, N., Dodsworth, S., Sang, P.Y., Knight, C., and Glen, R. (1997). A novel series of 2,5-substituted tryptamine derivatives as vascular 5HT1B/1D receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **40**, 2347-2362.

Montini, E., Andolfi, G., Caruso, A., Buchner, G., Walpole, S.M., Mariani, M., Consalez, G., Trump, D., Ballabio, A., and Franco, B. (1998). Identification and characterization of a novel serine-threonine kinase gene from the Xp22 region. *Genomics* **51**, 427-433.

Moriguchi, T., Kuroyanagi, N., Yamaguchi, K., Gotoh, Y., Irie, K., Kano, T., Shirakabe, K., Muro, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., Nishida, E., and Hagiwara, M. (1996). A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J. Biol. Chem.* **271**, 13675-13679.

- Morris, N.R. (1975). Mitotic mutants of *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res.* 26, 237-254.
- Muhsin, M., Graham, J., and Kirkpatrick, P. (2003). Gefitinib. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 515-516.
- Murray, E.G.D., Webb, R.A., and Swann, M.B.R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 29, 407-439.
- Muschal, S. "Strategie zur Charakterisierung des c-Met-Rezeptorkomplexes durch Strep-InIB" (Diplomarbeit). 2006. Abteilung für Zell- und Immunbiologie (Prof. J. Wehland), Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI).
- Nagar, B., Bornmann, W.G., Pellicena, P., Schindler, T., Veach, D.R., Miller, W.T., Clarkson, B., and Kuriyan, J. (2002). Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.* 62, 4236-4243.
- Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K., and Shimizu, S. (1989). Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342, 440-443.
- Naldini, L., Tamagnone, L., Vigna, E., Sachs, M., Hartmann, G., Birchmeier, W., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Blasi, F., and Comoglio, P.M. (1992). Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J.* 11, 4825-4833.
- Niemann, H.H., Jager, V., Butler, P.J., van den, H.J., Schmidt, S., Ferraris, D., Gherardi, E., and Heinz, D.W. (2007). Structure of the human receptor tyrosine kinase met in complex with the *Listeria* invasion protein InIB. *Cell* 130, 235-246.
- Noble, M.E., Endicott, J.A., and Johnson, L.N. (2004). Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* 303, 1800-1805.
- Noguchi, K., Fukazawa, H., Murakami, Y., and Uehara, Y. (2002). Nek11, a new member of the NIMA family of kinases, involved in DNA replication and genotoxic stress responses. *J. Biol. Chem.* 277, 39655-39665.
- Nuell, M.J., Stewart, D.A., Walker, L., Friedman, V., Wood, C.M., Owens, G.A., Smith, J.R., Schneider, E.L., Dell'Orco, R., Lumpkin, C.K., and . (1991). Prohibitin, an evolutionarily conserved intracellular protein that blocks DNA synthesis in normal fibroblasts and HeLa cells. *Mol. Cell Biol.* 11, 1372-1381.
- O'Connell, M.J., Krien, M.J., and Hunter, T. (2003). Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol.* 13, 221-228.
- O'regan, L., Blot, J., and Fry, A.M. (2007). Mitotic regulation by NIMA-related kinases. *Cell Div.* 2, 25.
- Obenauer, J.C., Cantley, L.C., and Yaffe, M.B. (2003). Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* 31, 3635-3641.
- Oda, Y., Nagasu, T., and Chait, B.T. (2001). Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome. *Nat. Biotechnol.* 19, 379-382.
- Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127, 635-648.
- Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell Proteomics* 1, 376-386.
- Orian-Rousseau, V., Chen, L., Sleeman, J.P., Herrlich, P., and Ponta, H. (2002). CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev.* 16, 3074-3086.

- Orian-Rousseau,V., Morrison,H., Matzke,A., Kastilan,T., Pace,G., Herrlich,P., and Ponta,H. (2007). Hepatocyte growth factor-induced Ras activation requires ERM proteins linked to both CD44v6 and F-actin. *Mol. Biol. Cell* 18, 76-83.
- Panek,R.L., Lu,G.H., Klutchko,S.R., Batley,B.L., Dahring,T.K., Hamby,J.M., Hallak,H., Doherty,A.M., and Keiser,J.A. (1997). In vitro pharmacological characterization of PD 166285, a new nanomolar potent and broadly active protein tyrosine kinase inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283, 1433-1444.
- Parida,S.K., Domann,E., Rohde,M., Muller,S., Darji,A., Hain,T., Wehland,J., and Chakraborty,T. (1998). Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol. Microbiol.* 28, 81-93.
- Pawson,T. and Nash,P. (2003). Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300, 445-452.
- Pearson,R.B. and Kemp,B.E. (1991). Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol.* 200, 62-81.
- Pierce,A., Unwin,R.D., Evans,C.A., Griffiths,S., Carney,L., Zhang,L., Jaworska,E., Lee,C.F., Blinco,D., Okoniewski,M.J., Miller,C.J., Bitton,D.A., Spooncer,E., and Whetton,A.D. (2007). Eight-channel iTRAQ enables comparison of the activity of 6 leukaemogenic tyrosine kinases. *Mol. Cell Proteomics.*
- Pirie,J.H.H. (1927). A new disease in veld rodents, "Tiger River disease". *Publ. S. Afr. Inst. Med. Res.* 3, 163-186.
- Ponzetto,C., Bardelli,A., Zhen,Z., Maina,F., dalla,Z.P., Giordano,S., Graziani,A., Panayotou,G., and Comoglio,P.M. (1994). A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 77, 261-271.
- Potempa,S. and Ridley,A.J. (1998). Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly. *Mol. Biol. Cell* 9, 2185-2200.
- Raingeaud,J., Whitmarsh,A.J., Barrett,T., Derijard,B., and Davis,R.J. (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell Biol.* 16, 1247-1255.
- Raman,M., Chen,W., and Cobb,M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26, 3100-3112.
- Reinders,J. and Sickmann,A. (2005). State-of-the-art in phosphoproteomics. *Proteomics* 5, 4052-4061.
- Reinl, T. "Auswirkung des *listeriellen* Virulenzfaktors InlB auf die Wirtszelle: Phosphoproteom- und Genexpressionsanalysen" (Diplomarbeit). 2004. Abteilung für Zell- und Immunbiologie (Prof. J. Wehland), Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF).
- Renzoni,A., Klarsfeld,A., Dramsi,S., and Cossart,P. (1997). Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infect. Immun.* 65, 1515-1518.
- Resing,K.A., Mansour,S.J., Hermann,A.S., Johnson,R.S., Candia,J.M., Fukasawa,K., Vande Woude,G.F., and Ahn,N.G. (1995). Determination of v-Mos-catalyzed phosphorylation sites and autophosphorylation sites on MAP kinase kinase by ESI/MS. *Biochemistry* 34, 2610-2620.
- Robert Koch Institut. Listeriose. 49. 2006.
- Roberts,A.J. and Wiedmann,M. (2003). Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 904-918.

- Roig,J., Groen,A., Caldwell,J., and Avruch,J. (2005). Active Ncrcc1 protein kinase concentrates at centrosomes early in mitosis and is necessary for proper spindle assembly. *Mol. Biol. Cell* 16, 4827-4840.
- Roig,J., Mikhailov,A., Belham,C., and Avruch,J. (2002). Ncrcc1, a mammalian NIMA-family kinase, binds the Ran GTPase and regulates mitotic progression. *Genes Dev.* 16, 1640-1658.
- Ross,P.L., Huang,Y.N., Marchese,J.N., Williamson,B., Parker,K., Hattan,S., Khainovski,N., Pillai,S., Dey,S., Daniels,S., Purkayastha,S., Juhasz,P., Martin,S., Bartlet-Jones,M., He,F., Jacobson,A., and Pappin,D.J. (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell Proteomics* 3, 1154-1169.
- Roux,P.P., Ballif,B.A., Anjum,R., Gygi,S.P., and Blenis,J. (2004). Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 13489-13494.
- Rubin,G.M., Yandell,M.D., Wortman,J.R., Gabor Miklos,G.L., Nelson,C.R., Hariharan,I.K., Fortini,M.E., Li,P.W., Apweiler,R., Fleischmann,W., Cherry,J.M., Henikoff,S., Skupski,M.P., Misra,S., Ashburner,M., Birney,E., Boguski,M.S., Brody,T., Brokstein,P., Celniker,S.E., Chervitz,S.A., Coates,D., Cravchik,A., Gabrielian,A., Galle,R.F., Gelbart,W.M., George,R.A., Goldstein,L.S., Gong,F., Guan,P., Harris,N.L., Hay,B.A., Hoskins,R.A., Li,J., Li,Z., Hynes,R.O., Jones,S.J., Kuehl,P.M., Lemaitre,B., Littleton,J.T., Morrison,D.K., Mungall,C., O'Farrell,P.H., Pickeral,O.K., Shue,C., VossHall,L.B., Zhang,J., Zhao,Q., Zheng,X.H., and Lewis,S. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287, 2204-2215.
- Saadat,I., Higashi,H., Obuse,C., Umeda,M., Murata-Kamiya,N., Saito,Y., Lu,H., Ohnishi,N., Azuma,T., Suzuki,A., Ohno,S., and Hatakeyama,M. (2007). *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* 447, 330-333.
- Sakata,H., Stahl,S.J., Taylor,W.G., Rosenberg,J.M., Sakaguchi,K., Wingfield,P.T., and Rubin,J.S. (1997). Heparin binding and oligomerization of hepatocyte growth factor/scatter factor isoforms. Heparan sulfate glycosaminoglycan requirement for Met binding and signaling. *J. Biol. Chem.* 272, 9457-9463.
- Sano,A. and Nakamura,H. (2004a). Chemo-affinity of titania for the column-switching HPLC analysis of phosphopeptides. *Anal. Sci.* 20, 565-566.
- Sano,A. and Nakamura,H. (2004b). Titania as a chemo-affinity support for the column-switching HPLC analysis of phosphopeptides: application to the characterization of phosphorylation sites in proteins by combination with protease digestion and electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Sci.* 20, 861-864.
- Scala,E., Ariani,F., Mari,F., Caselli,R., Pescucci,C., Longo,I., Meloni,I., Giachino,D., Bruttini,M., Hayek,G., Zappella,M., and Renieri,A. (2005). CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. *J. Med. Genet.* 42, 103-107.
- Scheid,M.P., Marignani,P.A., and Woodgett,J.R. (2002). Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol. Cell Biol.* 22, 6247-6260.
- Schlessinger,J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.
- Schmidt,T.G., Koepke,J., Frank,R., and Skerra,A. (1996). Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J. Mol. Biol.* 255, 753-766.
- Schomburg,I., Chang,A., Ebeling,C., Gremse,M., Heldt,C., Huhn,G., and Schomburg,D. (2004). BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments. *Nucleic Acids Res.* 32, D431-D433.
- Schubert,W.D., Gobel,G., Diepholz,M., Darji,A., Kloer,D., Hain,T., Chakraborty,T., Wehland,J., Domann,E., and Heinz,D.W. (2001). Internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes* combine three distinct folds into a contiguous internalin domain. *J. Mol. Biol.* 312, 783-794.

- Schwall,R.H., Chang,L.Y., Godowski,P.J., Kahn,D.W., Hillan,K.J., Bauer,K.D., and Zioncheck,T.F. (1996). Heparin induces dimerization and confers proliferative activity onto the hepatocyte growth factor antagonists NK1 and NK2. *J. Cell Biol.* *133*, 709-718.
- Seet,B.T., Dikic,I., Zhou,M.M., and Pawson,T. (2006). Reading protein modifications with interaction domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 473-483.
- Selbach,M. and Backert,S. (2005). Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens. *Trends Microbiol.* *13*, 181-189.
- Shah,N.P., Nicoll,J.M., Nagar,B., Gorre,M.E., Paquette,R.L., Kuriyan,J., and Sawyers,C.L. (2002). Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* *2*, 117-125.
- Shahbazian,D., Roux,P.P., Mieulet,V., Cohen,M.S., Raught,B., Taunton,J., Hershey,J.W., Blenis,J., Pende,M., and Sonenberg,N. (2006). The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J.* *25*, 2781-2791.
- Shen,Y., Naujokas,M., Park,M., and Ireton,K. (2000). InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* *103*, 501-510.
- Sonnenberg,E., Meyer,D., Weidner,K.M., and Birchmeier,C. (1993). Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J. Cell Biol.* *123*, 223-235.
- Srivastava,A.K. and Pandey,S.K. (1998). Potential mechanism(s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin. *Mol. Cell Biochem.* *182*, 135-141.
- Stamos,J., Lazarus,R.A., Yao,X., Kirchhofer,D., and Wiesmann,C. (2004). Crystal structure of the HGF beta-chain in complex with the Sema domain of the Met receptor. *EMBO J.* *23*, 2325-2335.
- Stensballe,A., Andersen,S., and Jensen,O.N. (2001). Characterization of phosphoproteins from electrophoretic gels by nanoscale Fe(III) affinity chromatography with off-line mass spectrometry analysis. *Proteomics* *1*, 207-222.
- Stoker,M., Gherardi,E., Perryman,M., and Gray,J. (1987). Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* *327*, 239-242.
- Sui,J., Tan,T.L., Zhang,J., Ching,C.B., and Chen,W.N. (2007). iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS analysis on protein profile in vascular smooth muscle cells incubated with S- and R-enantiomers of propranolol: possible role of metabolic enzymes involved in cellular anabolism and antioxidant activity. *J. Proteome. Res.* *6*, 1643-1651.
- Sun,H., Shen,Y., Dokainish,H., Holgado-Madruga,M., Wong,A., and Ireton,K. (2005). Host adaptor proteins Gab1 and CrkII promote InIB-dependent entry of *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol.* *7*, 443-457.
- Takahashi,M., Gotoh,Y., Isagawa,T., Nishimura,T., Goyama,E., Kim,H.S., Mukai,H., and Ono,Y. (2003). Regulation of a mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MLTK by PKN. *J. Biochem. (Tokyo)* *133*, 181-187.
- Tan,B.C. and Lee,S.C. (2004). Nek9, a novel FACT-associated protein, modulates interphase progression. *J. Biol. Chem.* *279*, 9321-9330.
- Tan,Y., Ruan,H., Demeter,M.R., and Comb,M.J. (1999). p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* *274*, 34859-34867.
- Tang,P., Sutherland,C.L., Gold,M.R., and Finlay,B.B. (1998). *Listeria monocytogenes* invasion of epithelial cells requires the MEK-1/ERK-2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Infect. Immun.* *66*, 1106-1112.

- Tao,J., Van Esch,H., Hagedorn-Greiwe,M., Hoffmann,K., Moser,B., Raynaud,M., Sperner,J., Fryns,J.P., Schwinger,E., Gecz,J., Ropers,H.H., and Kalscheuer,V.M. (2004). Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 1149-1154.
- Tassan,J.P. and Le,G., X (2004). An overview of the KIN1/PAR-1/MARK kinase family. *Biol. Cell* **96**, 193-199.
- Thery,C., Sharpe,M.J., Batley,S.J., Stern,C.D., and Gherardi,E. (1995). Expression of HGF/SF, HGF1/MSP, and c-met suggests new functions during early chick development. *Dev. Genet.* **17**, 90-101.
- Tilney,L.G. and Portnoy,D.A. (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* **109**, 1597-1608.
- Timm,T., Matenia,D., Li,X.Y., Griesshaber,B., and Mandelkow,E.M. (2006). Signaling from MARK to tau: regulation, cytoskeletal crosstalk, and pathological phosphorylation. *Neurodegener. Dis.* **3**, 207-217.
- Trost,M., Wehmhoner,D., Karst,U., Dieterich,G., Wehland,J., and Jansch,L. (2005). Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Proteomics* **5**, 1544-1557.
- Upadhyay,P., Birkenmeier,E.H., Birkenmeier,C.S., and Barker,J.E. (2000). Mutations in a NIMA-related kinase gene, *Nek1*, cause pleiotropic effects including a progressive polycystic kidney disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 217-221.
- Vanrobays,E., Gleizes,P.E., Bousquet-Antonelli,C., Noaillac-Depeyre,J., Caizergues-Ferrer,M., and Gelugne,J.P. (2001). Processing of 20S pre-rRNA to 18S ribosomal RNA in yeast requires Rrp10p, an essential non-ribosomal cytoplasmic protein. *EMBO J.* **20**, 4204-4213.
- Vazquez-Boland,J.A., Kocks,C., Dramsi,S., Ohayon,H., Geoffroy,C., Mengaud,J., and Cossart,P. (1992). Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* **60**, 219-230.
- Vazquez-Boland,J.A., Kuhn,M., Berche,P., Chakraborty,T., Dominguez-Bernal,G., Goebel,W., Gonzalez-Zorn,B., Wehland,J., and Kreft,J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 584-640.
- Veiga,E. and Cossart,P. (2005). *Listeria* hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* **7**, 894-900.
- Venter,J.C., Adams,M.D., Myers,E.W., Li,P.W., Mural,R.J., Sutton,G.G., Smith,H.O., Yandell,M., Evans,C.A., Holt,R.A., Gocayne,J.D., Amanatides,P., Ballew,R.M., Huson,D.H., Wortman,J.R., Zhang,Q., Kodira,C.D., Zheng,X.H., Chen,L., Skupski,M., Subramanian,G., Thomas,P.D., Zhang,J., Gabor Miklos,G.L., Nelson,C., Broder,S., Clark,A.G., Nadeau,J., McKusick,V.A., Zinder,N., Levine,A.J., Roberts,R.J., Simon,M., Slayman,C., Hunkapiller,M., Bolanos,R., Delcher,A., Dew,I., Fasulo,D., Flanigan,M., Florea,L., Halpern,A., Hannenhalli,S., Kravitz,S., Levy,S., Mobarry,C., Reinert,K., Remington,K., Abu-Threideh,J., Beasley,E., Biddick,K., Bonazzi,V., Brandon,R., Cargill,M., Chandramouliswaran,I., Charlab,R., Chaturvedi,K., Deng,Z., Di,F., V. Dunn,P., Eilbeck,K., Evangelista,C., Gabrielian,A.E., Gan,W., Ge,W., Gong,F., Gu,Z., Guan,P., Heiman,T.J., Higgins,M.E., Ji,R.R., Ke,Z., Ketchum,K.A., Lai,Z., Lei,Y., Li,Z., Li,J., Liang,Y., Lin,X., Lu,F., Merkulov,G.V., Milshina,N., Moore,H.M., Naik,A.K., Narayan,V.A., Neelam,B., Nusskern,D., Rusch,D.B., Salzberg,S., Shao,W., Shue,B., Sun,J., Wang,Z., Wang,A., Wang,X., Wang,J., Wei,M., Wides,R., Xiao,C., Yan,C., Yao,A., Ye,J., Zhan,M., Zhang,W., Zhang,H., Zhao,Q., Zheng,L., Zhong,F., Zhong,W., Zhu,S., Zhao,S., Gilbert,D., Baumhueter,S., Spier,G., Carter,C., Cravchik,A., Woodage,T., Ali,F., An,H., Awe,A., Baldwin,D., Baden,H., Barnstead,M., Barrow,I., Beeson,K., Busam,D., Carver,A., Center,A., Cheng,M.L., Curry,L., Danaher,S., Davenport,L., Desilets,R., Dietz,S., Dodson,K., Doup,L., Ferriera,S., Garg,N., Gluecksmann,A., Hart,B., Haynes,J., Haynes,C., Heiner,C., Hladun,S., Hostin,D., Houck,J., Howland,T., Ibegwam,C., Johnson,J., Kalush,F., Kline,L., Koduru,S., Love,A., Mann,F., May,D., McCawley,S., McIntosh,T., McMullen,I., Moy,M., Moy,L., Murphy,B., Nelson,K., Pfannkoch,C., Pratts,E., Puri,V., Qureshi,H., Reardon,M., Rodriguez,R., Rogers,Y.H., Romblad,D., Ruhfel,B.,

- Scott,R., Sitter,C., Smallwood,M., Stewart,E., Strong,R., Suh,E., Thomas,R., Tint,N.N., Tse,S., Vech,C., Wang,G., Wetter,J., Williams,S., Williams,M., Windsor,S., Winn-Deen,E., Wolfe,K., Zaveri,J., Zaveri,K., Abril,J.F., Guigo,R., Campbell,M.J., Sjolander,K.V., Karlak,B., Kejariwal,A., Mi,H., Lazareva,B., Hatton,T., Narechania,A., Diemer,K., Muruganujan,A., Guo,N., Sato,S., Bafna,V., Istrail,S., Lippert,R., Schwartz,R., Walenz,B., Yooseph,S., Allen,D., Basu,A., Baxendale,J., Blick,L., Caminha,M., Carnes-Stine,J., Caulk,P., Chiang,Y.H., Coyne,M., Dahlke,C., Mays,A., Dombroski,M., Donnelly,M., Ely,D., Esparham,S., Fosler,C., Gire,H., Glanowski,S., Glasser,K., Glodek,A., Gorokhov,M., Graham,K., Gropman,B., Harris,M., Heil,J., Henderson,S., Hoover,J., Jennings,D., Jordan,C., Jordan,J., Kasha,J., Kagan,L., Kraft,C., Levitsky,A., Lewis,M., Liu,X., Lopez,J., Ma,D., Majoros,W., McDaniel,J., Murphy,S., Newman,M., Nguyen,T., Nguyen,N., and Nodell,M. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
- Wallenius,V.R., Rawet,H., Skrtic,S., Helou,K., Qiu,Y., Levan,G., Ekberg,S., Carlsson,B., Isaksson,O.G., Nakamura,T., and Jansson,J.O. (1997). Chromosomal localization of rat hepatocyte growth factor (Hgf) and HGF receptor (Met) and characterization of HGF receptor cDNA. *Mamm. Genome* 8, 661-667.
- Walsh,C.T., Garneau-Tsodikova,S., and Gatto,G.J., Jr. (2005). Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 44, 7342-7372.
- Wang,J.Y. (1988). Antibodies for phosphotyrosine: analytical and preparative tool for tyrosyl-phosphorylated proteins. *Anal. Biochem.* 172, 1-7.
- Weaving,L.S., Christodoulou,J., Williamson,S.L., Friend,K.L., McKenzie,O.L., Archer,H., Evans,J., Clarke,A., Pelka,G.J., Tam,P.P., Watson,C., Lahooti,H., Ellaway,C.J., Bennetts,B., Leonard,H., and Gecz,J. (2004). Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 1079-1093.
- Wells,C.M., Ahmed,T., Masters,J.R., and Jones,G.E. (2005). Rho family GTPases are activated during HGF-stimulated prostate cancer-cell scattering. *Cell Motil. Cytoskeleton* 62, 180-194.
- Wessel,D. and Flugge,U.I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138, 141-143.
- Wissing,J., Godl,K., Brehmer,D., Blencke,S., Weber,M., Habenberger,P., Stein-Gerlach,M., Missio,A., Cotten,M., Muller,S., and Daub,H. (2004). Chemical proteomic analysis reveals alternative modes of action for pyrido[2,3-d]pyrimidine kinase inhibitors. *Mol. Cell Proteomics* 3, 1181-1193.
- Wissing,J., Jansch,L., Nimtz,M., Dieterich,G., Hornberger,R., Keri,G., Wehland,J., and Daub,H. (2007). Proteomics analysis of protein kinases by target class-selective prefractionation and tandem mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* 6, 537-547.
- Wong,K.A. and Lodish,H.F. (2006). A revised model for AMP-activated protein kinase structure: The alpha-subunit binds to both the beta- and gamma-subunits although there is no direct binding between the beta- and gamma-subunits. *J. Biol. Chem.* 281, 36434-36442.
- Woods,A., Salt,I., Scott,J., Hardie,D.G., and Carling,D. (1996). The alpha1 and alpha2 isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity in vitro. *FEBS Lett.* 397, 347-351.
- Woods,A., Vertommen,D., Neumann,D., Turk,R., Bayliss,J., Schlattner,U., Wallimann,T., Carling,D., and Rider,M.H. (2003). Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 28434-28442.
- Wyrick,P.B., Choong,J., Davis,C.H., Knight,S.T., Royal,M.O., Maslow,A.S., and Bagnell,C.R. (1989). Entry of genital Chlamydia trachomatis into polarized human epithelial cells. *Infect. Immun.* 57, 2378-2389.
- Xu,B., Wilsbacher,J.L., Collisson,T., and Cobb,M.H. (1999). The N-terminal ERK-binding site of MEK1 is required for efficient feedback phosphorylation by ERK2 in vitro and ERK activation in vivo. *J. Biol. Chem.* 274, 34029-34035.

Yang,J.J. (2002). Mixed lineage kinase ZAK utilizing MKK7 and not MKK4 to activate the c-Jun N-terminal kinase and playing a role in the cell arrest. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 105-110.

Zarnegar,R. and Michalopoulos,G. (1989). Purification and biological characterization of human hepatopoietin A, a polypeptide growth factor for hepatocytes. *Cancer Res.* 49, 3314-3320.

Zhang,Y., Wolf-Yadlin,A., Ross,P.L., Pappin,D.J., Rush,J., Lauffenburger,D.A., and White,F.M. (2005). Time-resolved mass spectrometry of tyrosine phosphorylation sites in the epidermal growth factor receptor signaling network reveals dynamic modules. *Mol. Cell Proteomics* 4, 1240-1250.

Zhou,H., Watts,J.D., and Aebersold,R. (2001). A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation. *Nat. Biotechnol.* 19, 375-378.

Zioncheck,T.F., Richardson,L., Liu,J., Chang,L., King,K.L., Bennett,G.L., Fugedi,P., Chamow,S.M., Schwall,R.H., and Stack,R.J. (1995). Sulfated oligosaccharides promote hepatocyte growth factor association and govern its mitogenic activity. *J. Biol. Chem.* 270, 16871-16878.

Zolnierowicz,S. and Bollen,M. (2000). Protein phosphorylation and protein phosphatases. De Panne, Belgium, September 19-24, 1999. *EMBO J.* 19, 483-488.

4. Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die mich während meiner Zeit am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in meiner Arbeit unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Jürgen Wehland für das hochinteressante Thema und die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit in der Abteilung für Zellbiologie.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. Lothar Jänsch für die fachliche Unterstützung während dieser Doktorarbeit, die ein oder andere spontane Pizza-Session zu später Stunde und die Korrektur-Lesung bedanken.

Frau Prof. Petra Dersch danke ich für die Übernahme des Koreferates und Herrn Prof. Norbert F. Käufer für die Übernahme des Prüfungs-Vorsitzes.

Für das Bereitstellen des Kinase-Inhibitors V16743 und des Wachstumsfaktors HGF/SF bedanke ich mich bei Dr. Henrik Daub und Dr. Ermanno Gherardi.

Besonderer Dank gilt all meinen Kollegen aus dem Gründerzentrum und dem A-Gebäude: Herrn Dr. Manfred Nimtz danke ich für die Unterstützung bei massenspektrometrischen Aufgaben und für viele Einblicke in die Tiefen der MS-Technologien. Dr. Josef Wissing gilt mein Dank für äußerst wertvolle Tipps und Tricks im Laboralltag sowie für den Genuss seiner hervorragenden Kochkünste. Kirsten Minkhart danke ich für die immense Ausdauer an der UPLC, für bereitwillige Überstunden bei wichtigen Proben und für die Verbreitung von „närrischer“ Laune auch außerhalb der Karnevals-Zeit. Bei Reiner Munder bedanke ich mich für kleine und große Arbeiten im Labor, für viele Stunden monotonen Zell-Schabens im 4°C-Raum und für die entspannenden Zigaretten-Pausen bei jeder Wetterlage. Für die stetige Versorgung mit aktueller Literatur und der Lösung von Hard- und Software-Fragen unterschiedlichster Arten danke ich Herrn Dr. Uwe Kärst. Bei Undine Felgenträger bedanke ich mich für die Messungen am Q-TOF2. Für Rat und Tat in der Zellkultur sowie für viele kleine nette Gespräche danke ich herzlich Brigitte Denker. Petra Hagendorff gilt mein Dank für Ihren unermüdlichen Einsatz bei Klonierarbeiten und für nützliche Hinweise bei der Proteinexpression und -reinigung. Dr. Christian Erck, Marlies Konradt und Hildegard Schwab-Hanisch danke ich für die Unterstützung bei der Antikörper-Herstellung und -Reinigung. Ein besonderes Dankeschön geht an Amanda Mühlmann für ihre stete Hilfsbereitschaft bei der Gestaltung von Reiseplänen ins In- und Ausland und der gelegentlichen Übernahme anderer organisatorischer Dinge, wodurch ich wertvolle Zeit gewinnen konnte.

Für die Lösung bioinformatischer Aufgabenstellungen bedanke ich mich herzlich bei Claudia Hundertmark. Meinem „Leidensgenossen“ Roman Fischer danke ich für fruchtbare Diskussionen, die seltenen aber lustigen Kneipenabende und die gemeinsame Entwicklung der Cross-Boule-Spielregeln. Für eine äußerst angenehme Diplomarbeit und für die Herstellung der InlB LoF-Variante danke ich Stefan Muschal. Desweiteren bedanke ich mich bei allen nicht-genannten Mitgliedern der Arbeitsgruppe CPRO und bei allen Kuchenspendern für sehr beliebte Kaffee-Pausen.

Ein ganz spezielles Dankeschön gilt meiner Freundin Astrid für die liebevolle Unterstützung während der letzten drei Jahre. Die vielen abwechslungsreichen gemeinsamen Stunden außerhalb des HZI habe ich sehr genossen. Abschließend möchte ich mich herzlich bei meiner Familie bedanken, die jeder Zeit für mich da war und immer an mich geglaubt hat. Eure Unterstützung und Euer Zuspruch haben all dies möglich gemacht.

IX Sachregister

Seitenangaben:	Grün	Einleitung
	Blau	Ergebnisse
	Rot	Diskussion
	Braun	Material und Methoden

A

AAPK1	siehe AMPK α -1
Abl	35
ACLY	66, 117
Affinitäts-Chromatographie	siehe V16743 bzw. IMAC
Aktin	3, 7, 10, 85, 87, 108, 115, 120-121, 123, 124
AMPK α -1	63-64, 76, 114-115
Antikörper	138-139
Arp2/3	7, 10, 85, 121, 123

B

BCR-Abl	33
Biochemische Methoden	
Immunodetektion	138-139, 146-147, 163-165
Proteinfärbung	136
Proteinkonzentration	137
SDS-PAGE	135-136
Tankblot-Transfer	137

C

CABL1	66, 70-71, 117
CDKL5	70, 115-116
CD44	10, 85-86, 121
Chemikalien	134ff.
Chromatographie	
HPLC	157-158
IMAC	siehe Phosphorylierung
RP	154-155
SCX	siehe Kationenaustausch-Chromatographie
V16743	siehe V16743
c-Met	
Aktivierung	9, 50, 69, 75, 108-111, 125-127, 146-147, 150-151
Anreicherung	101
Biologische Prozesse	9ff., 126

Domänenstruktur	8, 9
Expression	8, 49, 146
Invasion	siehe <i>Listeria monocytogenes</i>
Liganden	siehe Internalin B bzw. HGF/SF
Karzinome	10
Ko-Rezeptoren	6, 10, 121, 127
Prozessierung	8
Protein-Regulation	80, 106
Signalkaskade	7, 8ff., 51-52, 68-69, 74-75, 108-118, 125-127, 146-147
c-Src	9-10, 32-33, 35, 99, 101

D

DDR1	101
DDR2	101

E

ECH1	102
EGFR	27, 32, 99, 101
Entsalzen von Peptiden	154-155
Eph2A	101
Eph4B	101
Erk1/2	41-53, 60-61, 68-70, 74-76, 91-97, 106-111, 114
	siehe MAP-Kinasen
ERM	85-86, 121
ESI-MS	21, 158-159

F

FGFR	23, 33, 99, 101
------	-----------------

G

Gatekeeper	siehe Kinasen
gC1q-R	5, 6, 12
Gleevec	siehe Kinasen
Glykosaminoglykane	5, 6, 12
GSK3A	55, 58-59, 61-62, 69-70, 76-77, 106, 111
GSK3B	56, 61-62, 106, 111

H

HGF/SF	
differentiell phosphorylierte	74ff., 125-127

Kinasen	
Domänenstruktur	11
Expression	8, 11
Ligand für c-Met	12ff., 73ff., 125-127
Phosphokinom- Analysen	76-79, 125-127
Proteinregulation	79ff., 125-127
Prozessierung	11
Rekombinante Herstellung	145-146
Scattering	10
HGFR	siehe c-Met
HPLC	157-158
HPLC-ESI-MS	21, 157-160

I

ICAT	siehe Quantifizierung
IMAC	siehe Phosphorylierung
Immunoblot	siehe Biochemische Methoden (Tankblot-Transfer)
Immunopräzipitation	siehe Nek9
Inhibitoren	siehe Kinasen bzw. Phosphatase-Inhibitoren
INSR	101
Internaline	
Proteinfamilie	3
Domänenstruktur	4
InIA	siehe Internalin A
InIB	siehe Internalin B
Internalin A	
Domänenstruktur	4
Funktion als Invasin	5
Internalin B	
differentiell phosphorylierte Kinasen	59ff., 67ff., 111-118
Domänenstruktur	4, 11
Funktion als Invasin	5ff., 13
Ligand für c-Met	12, 48-53, 59-67, 67-72, 108-111
Loss of Function	67ff.
Phosphokinom-Analysen	59-67, 69-71, 111-118
Proteinregulation	79ff.
rekombinante Herstellung	48, 67, 142-145
Rezeptoren	6, 7
Iressa	siehe Kinasen
iTRAQ	siehe Quantifizierung
iTRAQassist	siehe Quantifizierung

K

- K0528 66, 117
- Kationenaustausch-Chromatographie 156-157
- Kinasen
- Affinitäts-Chromatographie 25ff., 30ff., 98-103, siehe V16743
 - Analyse von 45-47, 103-108
 - Phosphorylierungen
 - Dendrogramm 16
 - differentiell phosphoryliert 59ff., 67ff., 76ff., 112, 118
 - Gatekeeper 33-34, 42-43, 99-101
 - Inhibitoren 26, 27
 - Gleevec 33, 99
 - Iressa 27
 - LY294002 92-96, 123, 165-166
 - PD166285 32
 - PD173955 35
 - PP58 32-35, 42, 99-101
 - U0126 92-97, 123, 165-166
 - V16742 siehe V16743
 - Kinom 15ff., 101
 - Signaltransduktion 15ff.
- KS6A3 siehe RSK-2

L

- Lagerung von Zelllinien siehe Zellbiologische Arbeiten
- Listeria monocytogenes*
- Entdeckung 1
 - Morphologie 1
 - Vorkommen 1
 - Listeria spp.* 1
 - Genom 2
 - Listeriose 2
 - Infektionszyklus 3
 - InIA siehe Internalin A
 - InIB siehe Internalin B
 - Internaline 3-5
 - Invasion 5-7
- Lösemittel 134ff.
- LY294002 siehe Kinasen
- Lysispuffer
- Hochsalz 151
 - Niedrigsalz 163
 - SDS 136

M

MALDI-MS	21, 154-155
MAP-Kinasen	6, 10, 13, 106, 108-111, 113-114, 123, 125-127 siehe Erk1/2 bzw. Mek1/2
MARKs	70, 112-113
Medien	siehe Zellbiologische Arbeiten
Mek1/2	51-53, 63, 74-75, 79-80, 91-92, 113-114, siehe MAP-Kinasen
Mikrotubuli	112-113, 120
MKK6	81, 106
MLTK	78
MP2K1	siehe Mek1/2 bzw. MAP-Kinasen
MP2K2	siehe Mek1/2 bzw. MAP-Kinasen
MP2K6	siehe MKK6

N

Nek9	
Beschreibung	119-120
Immunoblot-Analysen	163-165
Immunopräzipitation	161-165
Lokalisation	87-91, 122, 124, 163-165
Phosphorylierung	64-65, 69, 76-78, 89-91, 94-97, 106, 116-117, 122-124
Protein-Interaktion	83-86, 121, 124, 161-163
Signalweg-Analysen	83ff., 91-97, 120, 123-124, 165-168
Nercc1	siehe Nek9
NQO2	102

P

p38	99, 102, 126-127
Passagieren von Zelllinien	siehe Zellbiologische Arbeiten
PDGFR	32, 33, 99, 101
PD166285	siehe Kinasen
PD173955	siehe Kinasen
Peptid-Identifizierung	159-160
Peptidreinigung	154-155
Peptidtrennung	156-158
Phosida	47, 66-67, 72, 89, 161
Phosphatasen	15, 18, 86, 113
Phosphatase-Inhibitoren	134-135
Phospho.ELM	47, 66-67, 72, 89, 161
Phosphokinom-Analysen	45ff., 54-59, 98-108, 106-107, 147ff.
InIB ₃₂₁	59-67, 111-118
InIB _{321/StrepIIIC} WT/LoF	69-71, 111-118
HGF/SF	76-79, 125-127

Phosphorylierung

- Anreicherung **19ff.**
- Datenbank-Vergleich **161**
- IMAC **20, 45-47, 103-105, 156**
- Interaktionsdomänen **15**
- Methoden **18ff.**
- MS-Analyse **18-21, 45-47, 103-105, 157-161**
- Protein-Phosphorylierung **14ff.**
- Quantifizierung siehe Quantifizierung
- reversibler Prozess **15**
- regulatorisches Element **14ff.**
- Immunodetektion **138-140**
 - InB₃₂₁ **50, 52, 61-62**
 - InB₃₂₁/StrepIIIC WT/LoF **69**
 - HGF/SF **75, 77**
- Phosphosite **47, 66-67, 72, 78, 89, 107, 161**
- PI3-Kinase **6, 9-10, 13, 51-53, 91-97, 108-111, 123-126**
- Posttranslationale Modifikationen **14**
- PP58 siehe Kinasen
- prfA **5**
- Prohibitin **82, 106**
- Prohibitin-2 **82**
- Proteinfällung **153**
- Proteinfärbung siehe Biochemische Methoden
- Protein-Identifizierung **159-160**
- Proteinkonzentration siehe Biochemische Methoden
- Proteinregulation siehe Quantifizierung
- Proteinverdau **154, 162**
- Proteom **18**
- Proteomforschung **18ff.**
- Puffer **134ff.**
- Pyrido[2,3-d]-Pyrimidin **31-34, 99, 147-148, siehe V16743 bzw. PP58**

Q

Quantifizierung

- ICAT **23**
- iTRAQ **24, 25, 105-108, 155**
 - iTRAQassist **57-59, 105-108**
 - Peptitregulation **55-59, 160-161**
 - Proteinregulation **55-59, 79ff., 160-161**
- Phosphorylierungen **22-25, 55-59, 103-108**
 - InB₃₂₁ **59-67, 111-118**
 - InB₃₂₁/StrepIIIC WT/LoF **69-71, 111-118**
 - HGF/SF **76-79, 125-127**
 - Nek9 **94ff.**
- SILAC **23**

Strategien **22ff.**

R

Reagenzien **134ff.**
 Regulationsanalyse siehe Quantifizierung
 Rekombinante Proteine
 InIB₃₂₁ **142**
 InIB₃₂₁/StreptIIIC WT/LoF **143-145**
 HGF/SF **145-146**
 Reversed Phase (RP) **154-155, 157-159**
 RIOK2 **70, 79, 115-116**
 RSK-2 **63-64, 106, 114**

S

Scansite **16, 89**
 SCX siehe Kationenaustausch-Chromatographie
 SDS-PAGE siehe Biochemische Methoden
 SILAC siehe Quantifizierung

T

Tankblot-Transfer siehe Biochemische Methoden
 Tryptischer Verdau **154, 162**

U

U0126 siehe Kinasen

V

V16743
 Affinitäts-Chromatographie **31, 37-44, 98-103, 152-153**
 Affinitätsmatrix **36, 98-103**
 Kinase-Gruppen **41, 101**
 Kopplung **35-36, 148-150**
 Struktur **32-34, 99-100**
 Synthese **147-148**
 Substrat-Spektrum **37-44, 100-102**
 Kinasen **37-40, 41-42, 100-101**
 Andere **37, 44, 101-102**
 Verdau **154, 162**

W

Wessel und Flügge- Extraktion

153

Westernblot

siehe Biochemische Methoden (Tankblot-Transfer)

Z

Zellbiologische Arbeiten

Lagerung von Zelllinien

141

Medien

140

Passagieren von Zelllinien

141

Stimulation von Zellen

146-147, 150-151, 161, 164-165

Zellextrakte

151

Zelllinien

49-50, 140

Zellyse

146, 151, 163

ZipTip-Reinigung

154-155